

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
4 janvier 2001 (04.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/00833 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12N 15/29,  
15/82, A01H 5/00

(74) Mandataire: CATHERINE, Alain; Cabinet Harlé &  
Phélip, 7, rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/01768

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international: 23 juin 2000 (23.06.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:  
99/08185 25 juin 1999 (25.06.1999) FR

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*):  
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147, rue de l'Uni-  
versité, F-75341 Paris Cedex 07 (FR).

**Publiée:**

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): HOFF-  
MANN, Beate [DE/FR]; 31, avenue d'Aigrefoin, F-78114  
Magny les Hameaux (FR). MOLLIER, Pascale [FR/FR];  
1, rue de la Gruerie, F-91190 Gif sur Yvette (FR). PEL-  
LETIER, Georges [FR/FR]; 28, avenue de L'Espérance,  
F-91440 Bures sur Yvette (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: PROMOTER EXPRESSED SPECIFICALLY IN THE CELLS OF PLANT ROOTS. RECOMBINANT VECTORS AND  
HOST CELLS COMPRISING SAME AND TRANSGENIC PLANTS OBTAINED

(54) Titre: PROMOTEUR S'EXPRIMANT SPECIFIQUEMENT DANS LES CELLULES DE RACINES DE PLANTES.  
VECTEURS ET CELLULES HOTES RECOMBINANTES COMPRENANT UN TEL PROMOTEUR ET PLANTES  
TRANSGENIQUES OBTENUES

(57) Abstract: The invention concerns a novel plant promoter capable of directing the expression of a nucleotide sequence of interest  
in the cells of a plant root, and recombinant vectors containing such a promoter, preferably associated with a nucleotide sequence  
whereof the expression is desired in constitutive cells of plant roots.

(57) Abrégé: La présente invention concerne un nouveau promoteur végétal capable de diriger l'expression d'une séquence nu-  
cléotidique d'intérêt dans les cellules de la racine d'une plante, ainsi que des vecteurs recombinants contenant un tel promoteur,  
de préférence associée à une séquence nucléotidique dont l'expression est recherchée dans les cellules constitutives des racines de  
plantes.

WO 01/00833 A1

**Promoteur s'exprimant spécifiquement  
dans les cellules de racines de plantes, vecteurs  
et cellules hôtes recombinantes comprenant un tel  
promoteur et plantes transgéniques obtenues**

5

La présente invention concerne un nouveau promoteur végétal capable de diriger l'expression d'une séquence nucléotidique d'intérêt dans les cellules de la racine d'une plante, ainsi que des vecteurs recombinants contenant un tel promoteur, de préférence associée à une  
10 séquence nucléotidique dont l'expression est recherchée dans les cellules constitutives des racines de plantes.

Dans les années récentes, les applications industrielles rendues possibles par les transformations des plantes à l'aide du génie génétique ont été croissantes.

15

De nombreux gènes d'origine procaryote ou eucaryote (d'animaux ou de plantes), codant spécifiquement pour des protéines conférant de nouvelles propriétés agronomiques, ont été isolés et transférés chez les plantes par génie génétique.

20

Dans un grand nombre de cas, les gènes qui ont été introduits dans des plantes constituent des séquences chimères, associant des éléments régulateurs d'origines différentes.

Ainsi, le gène codant pour une protéine d'intérêt est souvent placé sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort permettant à ladite protéine d'être exprimée dans la totalité de la plante.

25

A titre d'exemple, le promoteur du transcrit 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (35S CaMV) a été largement utilisé dans des constructions de gènes chimères pour l'expression de protéines d'intérêt chez les plantes.

30

Désormais, pour un grand nombre d'applications, il n'est pas nécessaire que la protéine d'intérêt conférant la propriété agronomique recherchée présente une expression distribuée dans la totalité des organes et/ou des types cellulaires de la plante transformée.

35

Très précocement, la recherche d'une expression plus spécifique du gène d'intérêt a été entreprise et a conduit, par exemple, à l'identification de promoteurs spécifiques de tissus ou d'organes.

En particulier, un promoteur dirigeant l'expression d'un polynucléotide d'intérêt de façon à la fois forte et ciblée dans la racine permettrait de nombreuses applications que l'on peut classer comme suit :

- 5 (i) défense contre les pathogènes à point d'entrée racinaire, telles que des bactéries, des champignons, des nématodes ou des insectes.
- (ii) résistance au stress (froid, stress hydrique, stress salin);
- (iii) amélioration de la qualité (exemple: augmenter la teneur en  
10 saccharose dans la betterave à sucre);
- (iv) nutrition (exemple: exprimer un gène de transporteur des nitrates).

Comme déjà indiqué plus haut, les promoteurs décrits dans l'état de la technique ne permettent pas l'expression d'un polynucléotide  
15 d'intérêt dans l'ensemble des couches cellulaires de la racine y compris toutes les assises.

Par exemple, le gène *arsk1* d'*A. thaliana* (Hwang *et al.*, 1995) est exprimé spécifiquement dans la racine, mais son expression est limitée aux couches externes de la racine (épiderme, endoderme, cortex)  
20 c'est-à-dire les cellules impliquées dans l'absorption d'eau. L'expression est très faible dans le système vasculaire. Le profil d'expression de ce gène évoque un rôle dans le stress hydrique. De fait, l'expression de ce gène est inductible par un stress hydrique (exposition des racines à l'air, ou traitement des racines par l'ABA ou NaCl), et diminue fortement  
25 lorsque les racines sont réhydratées.

Un autre exemple illustratif est le mutant *scarecrow* d'*A. thaliana* (Malamy *et al.* 1997) qui est affecté dans l'organisation radiale de la racine: les couches de l'endoderme et du cortex ne s'individualisent pas et restent fusionnées en une couche mutante possédant des  
30 caractéristiques de l'endoderme et du cortex. Le gène *scarecrow* affecté par la mutation est exprimé dans l'endoderme, les cellules initiales de l'endoderme, et parfois dans le centre quiescent de la racine.

De plus, les promoteurs décrits dans l'état de la technique, d'une part, ne permettent pas un haut niveau d'expression du

polynucléotide d'intérêt, et d'autre part, ne sont pas actifs tout au long du développement de la plante.

Le besoin d'un promoteur végétal fort, spécifique des racines, et actif quel que soit le stade de développement de la plante, est  
5 désormais comblé selon la présente invention.

La demanderesse a ainsi isolé, à partir du génome végétal d'*Arabidopsis thaliana*, un nouveau promoteur capable de diriger l'expression d'un polynucléotide d'intérêt spécifiquement dans les racines d'une plante, ledit promoteur assurant un haut niveau  
10 d'expression du polynucléotide d'intérêt à la fois dans l'épiderme, le cortex, le vaisseau ou l'endoderme ainsi que dans toutes les assises de la racine, ceci durant tous les stades de développement de la plante.

Ainsi, la présente invention est relative à un acide nucléique isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide codant pour un  
15 promoteur végétal capable de diriger l'expression d'une séquence nucléotidique d'intérêt dans les cellules de la racine d'une plante, durant la totalité du développement de cette dernière, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

De préférence, un acide nucléique selon l'invention se présente  
20 sous une forme isolée ou purifiée.

Le terme « isolé » au sens de la présente invention désigne un matériel biologique qui a été soustrait à son environnement originel (l'environnement dans lequel il est localisé naturellement). Par exemple, un polynucléotide présent à l'état naturel dans une plante ou un animal  
25 n'est pas isolé. Le même polynucléotide séparé des acides nucléiques adjacents au sein desquels il est naturellement inséré dans le génome de la plante ou l'animal est isolé.

Un tel polynucléotide peut être inclus dans un vecteur et/ou un tel polynucléotide peut être inclus dans une composition et demeurer  
30 néanmoins à l'état isolé du fait que le vecteur ou la composition ne constitue pas son environnement naturel.

Le terme « purifié » ne nécessite pas que le matériel soit présent sous une forme de pureté absolue, exclusive de la présence d'autres composés. Il s'agit plutôt d'une définition relative.

Un polynucléotide est à l'état purifié après purification du matériel de départ ou du matériel naturel d'au moins un ordre de grandeur, de préférence 2 ou 3 et préférentiellement 4 ou 5 ordres de grandeur.

5           Aux fins de la présente description, l'expression « séquence nucléotidique » peut être employée pour désigner indifféremment un polynucléotide ou un acide nucléique. L'expression « séquence nucléotidique » englobe le matériel génétique lui-même et n'est donc pas restreinte à l'information concernant sa séquence.

10           L'invention concerne également un acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°1, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

15           Le « pourcentage d'identité de nucléotides » entre deux séquences, au sens de la présente invention, peut être déterminé en comparant deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison. La partie de la séquence nucléotidique dans la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des additions ou des délétions (par exemple des « gaps ») par rapport à la séquence de  
20           référence (qui ne comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal des deux séquences.

25           Le pourcentage est calculé en déterminant le nombre de positions auxquelles une base nucléique identique est observée pour les deux séquences comparées, puis en divisant le nombre de positions auxquelles il y a identité des deux bases par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par 100 afin d'obtenir le pourcentage d'identité de séquence.

30           L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus (par exemple le logiciel FASTA de la Société WISCONSIN GENETICS SOFTWARE PACKAGE, GENETICS COMPUTER GROUP (GCG), 575 Science Doctor, Madison , Wis).

35           A titre d'illustration, le pourcentage d'identité de séquence pourra être effectué à l'aide du logiciel précité FASTA, en utilisant exclusivement les paramètres par défaut.

Ainsi, les différences nucléotidiques que peut comprendre un acide nucléique selon l'invention par rapport à la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 peut résulter en des substitutions, délétions ou additions d'un ou plusieurs nucléotides consécutifs ou non.

5 Font également partie de l'invention des acides nucléiques comprenant tout ou partie d'un polynucléotide possédant au moins 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5%, ou encore 99,8% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°1, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

10 Selon un autre aspect, l'invention est également relative à un acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'un polynucléotide hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°1, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

15 Par « partie » d'un polynucléotide promoteur selon l'invention, on entendra une séquence nucléotidique d'une longueur en bases inférieure à celle de la séquence SEQ ID N°1 et conservant la capacité à diriger l'expression d'une séquence nucléotidique d'intérêt dans les cellules de la racine d'une plante.

20 L'activité biologique d'une partie d'un polynucléotide promoteur selon l'invention peut être aisément vérifiée par l'homme du métier, notamment à l'aide des constructions de vecteurs et des procédés de transformation de plantes avec ces derniers, tels que décrits dans les exemples.

25 Par « partie » d'un promoteur selon l'invention, on entend notamment les séquences candidates suivantes:

- le polynucléotide allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3;
- le polynucléotide allant du nucléotide en position 493 jusqu'au
- 30 nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3;
- le polynucléotide allant du nucléotide en position 1076 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3;
- le polynucléotide allant du nucléotide en position 1976 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3; et

- le polynucléotide allant du nucléotide en position 2040 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3.

A titre illustratif, une partie d'un polynucléotide promoteur selon l'invention peut être obtenue par coupure enzymatique d'un acide nucléique tel que décrit ci-dessus, notamment un acide nucléique de séquence SEQ ID N°1, à l'aide d'endonucléases de restriction.

Une « partie » d'un polynucléotide promoteur selon l'invention peut être aussi obtenue par exemple par délétion d'un ou plusieurs nucléotides du polynucléotide de séquence SEQ ID N°1 à l'aide de la technique à l'exonucléase III décrite dans les exemples. Un polynucléotide partie du promoteur végétal selon l'invention a avantageusement une longueur en nucléotides allant de 200, 250, 300, 400, 500, 750, 100, 1200, 1500 ou 2000 nucléotides (ou paire de bases s'il se présente sous la forme double brin).

L'homme du métier peut à cet effet utiliser la carte de restriction de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1, représentée à la figure 1.

Pour la mise en oeuvre d'enzymes de restriction aux fins d'obtenir des fragments de polynucléotides correspondant à une partie d'un polynucléotide promoteur selon l'invention, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à l'ouvrage de Sambrook *et al.* (1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York).

Une partie d'un polynucléotide promoteur selon l'invention pourra également être préparée par amplification spécifique du fragment d'intérêt à l'aide d'un couple d'amorces encadrant, respectivement du côté 5' et du côté 3', la séquence d'intérêt, par exemple à l'aide de la méthode PCR, telle que décrite notamment dans les brevets américains N°US 4 683 195, US 4,683,202 et US 4,965,188.

Par « conditions d'hybridation de forte stringence » au sens de la présente invention, on entendra les conditions d'hybridation suivantes:

- préhybridation des filtres pendant 8 heures à 65°C dans un tampon composé de 6 x SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0,02% PVP, 0,02% Ficoll, 0,02% BSA, et 500 µg par ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé;

- hybridation des filtres pendant 48 heures à 65°C en présence de tampon 1 x SSC correspondant à 0,15 M de NaCl et 0,05M de citrate de sodium;

5

- trois lavages des filtres dans une solution contenant 2 x SSC et 0,1% SDS à 68°C pendant 15 minutes.

10 Les conditions d'hybridation décrites plus haut sont adaptées à l'hybridation, dans des conditions de forte stringence, d'une molécule d'acide nucléique d'une longueur de 20 nucléotides.

Il va sans dire que les conditions d'hybridation ci-dessus décrites doivent être adaptées en fonction de la longueur de l'acide nucléique dont l'hybridation est recherchée, selon des techniques bien  
15 connues de l'homme du métier.

Les conditions convenables d'hybridation peuvent par exemple être adaptées selon l'enseignement contenu dans l'ouvrage de Hames et Higgins (1985, *Nucleic Acid Hybridization : A practical approach*, Hames and Higgins Ed., IRL Press, Oxford), ou encore dans l'ouvrage  
20 de Sambrook *et al.* (1989) précité.

L'invention concerne également un acide nucléique comprenant un polynucléotide promoteur tel que défini ci-avant, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une séquence nucléotidique d'intérêt fonctionnellement associée au promoteur végétal et dont l'expression est  
25 recherchée dans les cellules de la racine d'une plante.

Un acide nucléique répondant à une telle définition est par exemple l'acide nucléique de séquence nucléotidique SEQ ID N°2 comprenant la séquence du gène *gus* placé sous le contrôle du promoteur de séquence nucléotidique SEQ ID N°1.

30 De manière avantageuse, un tel acide nucléique comprendra une séquence nucléotidique d'intérêt choisie parmi les séquences codantes de gène interagissant avec des parasites ou des pathogènes tels que les nématodes ou les champignons, comme par exemple les séquences codantes de glucanase, ladite séquence nucléotidique



d'intérêt étant placée sous le contrôle d'un polynucléotide promoteur selon l'invention.

Il peut également s'agir de séquences d'endochitinases telles que celles décrites dans le brevet européen n° EP 493,581 ou encore de  
5 séquences de gènes agissant sur la teneur en sucre de la plante.

A titre d'exemple, les séquences codantes de gènes d'intérêt assurant la protection d'une plante contre d'autres conditions de stress pourront être avantageusement placées sous le contrôle d'un polynucléotide promoteur selon l'invention.

10 Stress hydrique ou salin:

- gène *arsk1* (Hwang, I. *et al.* ; 1995);
- CDNA pA9 (Winicov, I. , Deutch S.E. 1994);
- CDNA Alfin 1 (Bastola, DR *et al.* 1998).

D'autres séquences codantes pourraient être utilisées sous le  
15 contrôle du promoteur selon l'invention, pour agir sur la teneur en saccharose de la betterave à sucre: gène *BvSPS1* (Hesse H. *et al.*, 1995), ou surexprimer un gène déjà exprimé physiologiquement comme les gènes de transporteurs de nitrate *NRT<sub>1</sub>* ou *NRT<sub>2</sub>* ( Crawford, N.M. *et al.* ,1998; Leah R. *et al.*, 1991).

20 L'invention est en outre relative à des fragments nucléotidiques comprenant 10 à 2000 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'invention, en particulier d'un acide nucléique possédant au moins 80% d'identité en nucléotide avec la séquence SEQ ID N°1 ou encore un acide nucléique hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte  
25 stringence, avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°1, ou d'un acide nucléique de séquence complémentaire.

De préférence, de tels fragments auront une longueur de 10, 12, 15, 18 ou 20 à 25, 35, 40, 50, 70, 80, 100, 200, 500, 1000, 1500 ou 2000 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide promoteur selon  
30 l'invention ou consistant en des fragments d'une longueur de 12, 15, 18, 20, 25, 35, 40, 50, 70, 80, 100, 200, 500, 1000, 1500 ou 2000 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide promoteur selon l'invention.

De tels fragments nucléotidiques pourront avantageusement être mis en oeuvre en tant que sondes ou amorces nucléotidiques aux  
35 fins de détection ou d'amplification de la totalité ou d'une partie d'une

séquence à activité promoteur spécifique des racines de plantes selon l'invention.

Selon encore un autre aspect, l'invention concerne un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression comprenant un  
5 polynucléotide promoteur selon l'invention. Un tel vecteur recombinant comprendra avantageusement une séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle dudit promoteur végétal.

Des vecteurs pouvant être utilisés aux fins de la présente invention sont notamment les suivants:

10

- vecteur pBIN19 (Bevan *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research, vol. 12: 8711-8721, commercialisé par la Société CLONTECH, Palo Alto, Californie, USA);

15

- vecteur 101 (Jefferson, 1987, Plant Molecular Biology Reporter, vol.5: 387-405, commercialisé par la Société CLONTECH);

- vecteur pBI221 (Jefferson, 1987, Plant Molecular Biology Reporter, vol.5: 387-405, commercialisé par la Société CLONTECH);

20

- vecteur pBI121 (Jefferson, 1987, Plant Molecular Biology Reporter, vol.5: 387-405, commercialisé par la Société CLONTECH).

- vecteur pEGFP (Cormack, B.P. *et al.* 1996; Yang T.T. *et al.*, 1996), commercialisé par la Société Clontech.

25

- vecteur pC-gus représenté à la figure 10.

Un vecteur recombinant préféré selon l'invention est par exemple le vecteur recombinant contenu dans la souche d'*E. Coli* déposée à la Collection Nationale de Culture de Micro-Organismes  
30 (CNCM) le 25 Mai 1999 sous le n° d'accès I-2218.

L'invention a en outre pour objet une cellule hôte recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique à activité de promoteur végétal spécifique des racines de plantes selon l'invention, éventuellement associée à un polynucléotide d'intérêt placé sous le

contrôle de ce dernier, ou un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus.

Les cellules hôtes recombinantes préférées selon l'invention peuvent être indifféremment d'origine bactérienne ou végétale.

5 Ainsi, peuvent notamment être utilisées des cellules bactériennes de différentes souches de *E. coli* ou encore d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Il s'agit également de cellules de plantes transformées par un vecteur conforme à l'invention, tel que des cellules d'*Arabidopsis thaliana*, de colza, de tabac ou encore de maïs.

10 Une cellule hôte recombinante préférée selon l'invention est la cellule de la souche de *E.coli* déposée à la CNCM le 25 Mai 1999 sous le n° d'accès I-2218.

L'invention concerne aussi un organisme multicellulaire végétal recombinant caractérisé en ce qu'il comprend des cellules hôtes recombinantes telles que définies ci-dessus.

L'invention concerne en particulier une plante transgénique comprenant, sous une forme intégrée dans son génome, un acide nucléique selon l'invention, en particulier un acide nucléique comprenant un polynucléotide promoteur conforme à l'invention et une séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle de ce dernier.

20 Une plante transgénique selon l'invention peut être notamment un colza, un tabac, un maïs ou encore *Arabidopsis thaliana*.

Les plantes transgéniques telles que définies ci-dessus ont donc la propriété d'exprimer une séquence nucléotidique d'intérêt spécifiquement au niveau des différents types cellulaires de la racine ( de l'extérieur vers l'intérieur: épiderme, cortex, endoderme, pericycle, vaisseau ), à tous les stades de développement de la plante.

L'invention a en outre pour objet un procédé d'obtention d'une plante transgénique exprimant spécifiquement une séquence nucléotidique d'intérêt dans les cellules de la racine à tous les stades de développement de ladite plante, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

30 a) obtention d'une cellule hôte recombinante végétale conforme à l'invention;

b) régénération d'une plante entière à partir de la cellule hôte recombinante obtenue à l'étape a);

c) sélection des plantes obtenues à l'étape b) ayant intégré la séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur végétal selon l'invention.

L'invention est également relative à un procédé d'obtention d'une plante transgénique caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a) obtention d'une cellule hôte recombinante d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant une séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur végétal selon l'invention;

b) transformation de la plante d'intérêt par infection avec la cellule hôte recombinante d'*Agrobacterium tumefaciens* obtenue à l'étape a);

c) sélection des plantes ayant intégré la séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur végétal selon l'invention.

L'invention a en outre pour objet un procédé d'obtention d'une plante transgénique caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes:

a) transfection d'une cellule de plante avec un acide nucléique ou un vecteur recombinant comprenant une séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur selon l'invention;

b) régénération d'une plante entière à partir de cellules de plante recombinantes obtenues à l'étape a) ;

c) sélection des plantes ayant intégré la séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur végétal selon l'invention.

L'un quelconque des procédés d'obtention d'une plante transgénique ci-dessus décrit peut en outre comporter les étapes additionnelles suivantes:

d) croisement entre elles de deux plantes transgéniques telles qu'obtenues à l'étape c);

e) sélection des plantes homozygotes pour le transgène.

5 Selon une autre alternative, l'un quelconque des procédés ci-dessus décrits pourra en outre comprendre les étapes suivantes:

d) croisement d'une plante transgénique obtenue à l'étape c) de l'un quelconque de ces procédés avec une plante de la même espèce;

10 e) sélection des plantes issues du croisement de l'étape d) ayant conservé le transgène.

L'invention a en outre pour objet une plante transgénique telle qu'obtenue selon l'un quelconque des procédés ci-dessus.

15 De manière préférée, une plante transgénique selon l'invention a non seulement intégré dans son génome un transgène comprenant une séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur végétal présentement décrit mais exprime ladite séquence nucléotidique d'intérêt majoritairement ou exclusivement  
20 dans les cellules constitutives de la racine.

Enfin, l'invention concerne aussi une semence de plante dont les cellules constitutives comprennent dans leur génome un acide nucléique selon l'invention.

25 Il s'agit notamment d'une semence de *Arabidopsis thaliana*, de colza, de tabac ou de maïs ayant incorporé un acide nucléique selon l'invention.

L'invention sera en outre illustrée, sans pour autant être limitée, par les figures et les exemples suivants.

30 La figure 1 représente une carte de restriction de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1.

Les motifs suivants ont été identifiés dans cette séquence: deux motifs TGACG correspondant au site de fixation du facteur Asf1 spécifique de la racine dans le promoteur 35 S du CaMV (position 1000-  
35 1004 et 1866-1870), deux motifs proches, à un nucléotide près, de

séquences enhancer du même promoteur 35S (position 28-35: CTGAAAG, au lieu de GTGAAAG et position 882-889: GTGCTTTG, au lieu de GTGGTTTG) et 3G-box ACGT (positions 285-288, 604-607, 1107-1110). Par ailleurs, cette séquence comporte 21 motifs TATA et 9 motifs CAAT.

L'importance fonctionnelle de ces motifs pourra être évaluée par la méthode à l'exonucléase III, selon Ausubel *et al.* (1989). Cette méthode permet d'obtenir des fragments de promoteur de taille décroissante, qui seront clonés en amont du gène *gus* dans un vecteur permettant la transformation d'*Arabidopsis*.

La figure 2 illustre la construction 1 ayant été utilisée pour l'isolement du promoteur selon l'invention, en l'absence (figure 2a) ou en présence (fig.2b) de l'insert.

L'insert de 4.27 kb est cloné à partir du vecteur de « kanamycin rescue » (figure 7) dans l'ADN-T du vecteur pBin19 par une double digestion EcoRI-XbaI. Cet insert comporte 2.14 kb de séquence génomique du clone Ir1 ( SEQ ID N°3 nct 136-2284) et 2.13kb de l'ADN-T de pGKB5: séquence codante de *gus* et signal de polyadénylation nos (figure 8 - nct 632-2762).

LB : bordure gauche de l'ADN-T de pBin19.

LacZ: lacZ région du phage M13mp19.

NPTII: fragment contenant le promoteur nos, le gène de résistance à la néomycine, et le site de polyadénylation nos.

RB : bordure droite de l'ADN-T de pBin19.

kan: fragment contenant l'origine de réplication RK2 du plasmide pRK252 et le gène kan de résistance à la kanamycine de *Streptococcus*.

La figure 3 illustre l'expression GUS du transformant d'*Arabidopsis* (écotype WS) au cours du développement.

a- 7 jours après germination.

b- 14 jours après germination.

c- 24 jours après germination.

d- détail d'une racine.

La figure 4 illustre une coupe transversale de racine du transformant après révélation de l'activité GUS.

La figure 5 représente une autoradiographie d'un Northern blot hybridé avec une sonde GUS.

6 µg d'ARN ont été déposés dans chaque puits.

Puits n°1-3-5: ARN de parties aériennes du transformant homozygote n°1, n°13 et de plante non transformée WS, respectivement.

Puits n°2-4-6: ARN de racines des mêmes plantes.

La figure 6 illustre l'analyse quantitative de l'expression GUS de transformants d'*Arabidopsis* obtenus avec la construction 1, au cours du développement. Elle matérialise la comparaison de l'activité GUS dans les racines et la partie aérienne du transformant initial (a) et des transformants individuels caractéristiques 6-1 et 2b (b-c), au cours du développement.

L'activité gus est exprimée en unités de fluorescence par minute et par :

- 1 µg de protéines (racines)
- 20 µg de protéines (feuilles)

A 2,72 unités de fluorescence correspond 1 pmol du produit mu, qui est le produit de la catalyse enzymatique du substrat mug (4-méthyl-β-D glucuronide) par GUS.

La figure 7 illustre le vecteur obtenu à la suite du « Kanamycin rescue ». La technique de « kanamycine rescue » utilise le vecteur P38 (a), qui comporte le début du gène NptII de résistance à la kanamycine, jusqu'au site PstI, en aval d'un promoteur IS50. Après digestion par PstI du vecteur P38 et de l'ADN du transformant, ligation des deux et sélection sur kanamycine, on obtient le vecteur montré en b). L'insert 1 est le fragment PstI obtenu à partir de l'ADN génomique du transformant: il comporte la région promotrice (SEQ ID N°1, nct 1 à

2149) accolée au fragment d'ADN-T délimité par le site d'insertion côté RB et le site PstI situé dans le gène de la kanamycine (figure 8, nct 632 à 4279). Le gène de résistance à la kanamycine se trouve ainsi reconstitué et le vecteur recombinant est sélectionné sur kanamycine.

5

La figure 8 donne une représentation schématique de l'ADN-T de PGKB5 utilisé pour créer la collection de transformants de Versailles.

La figure 9 illustre la séquence de l'ADN-T de PGKB5, également référencée comme la séquence SEQ ID N°5.

10

- RB bordure de 24 pb: 574-596,

- gène *gus* : séquence *gus* sans promoteur : 638-2504  
(ATG:638-640, codon stop: 2444-2446), site de polyadénylation du *gus*:  
3'nos: 2505-2793, site EcoRI: AATT/C:2759-2763.

15

- gène *KanR* : promoteur nos: 4752-4480, séquence *KanaR*:  
4479-3490 (ATG: 4466-4464, codon stop : 3665-3663, site PstI:  
CTGCA/G : 4275-4280), site ocs3': 3489-2794.

20

- gène *PhosphinothricineR* (*bastaR*): promoteur 35S: 4767-  
5890, séquence *phosphinothricineR*: 5890-6503 (ATG:5930-5932, codon  
stop: 6480-6482), site 3'g7: 6504-6789.

- LB bordure de 24 pb: 6962-6986.

La figure 10 représente une carte détaillée du vecteur pC-gus  
utilisé dans l'exemple 5.

25

### EXEMPLES:

### MATERIELS ET METHODES:

30

#### **I - Transformation**

(Bechtold N., Ellis J., Pelletier G. , 1993. *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C.R. Acad. Sci. Paris* **316**: 1194-1199.)



6 mg de graines (soit environ 300 graines) d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype Wassilevskija ont été semés sur des bacs de compost 40 x 30 cm. Les bacs sont laissés 64 h à 4°C pour la germination, puis  
5 sont placés en serre (photopériode : 16h de jour, température : 15° C nuit / 25°C minimum jour) et arrosés avec la solution nutritive standard de Coïc et Lessaint (Coïc, Y., Lessaint, C. 1971. Comment assurer une bonne nutrition en eau et ions minéraux en horticulture. *Hortic. fr.*8:11-14).

10 MP5-1 *Agrobacterium* est cultivé dans du milieu LB ( Luria-Bertani, Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York ) avec 50 mg/l de rifampicine, 100 mg/l de gentamycine et 200 mg/l de kanamycine, 14h à 28°C (jusqu'à A600=0.8). Après centrifugation, le culot de bactéries est  
15 remis en suspension dans le milieu d'infiltration (MI), à un tiers du volume de culture initial (MI= macro et micro nutriments de Murashige et Skoog, contenant 10 µg/l 6-benzylaminopurine et 5% sucrose (Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497). Des  
20 lots de 100 à 500 plantes de 3 à 4 semaines bien développées ont été extraits du sol, rincés à l'eau, immergés dans 2l de milieu MI contenant *Agrobacterium* dans une cloche à vide de 10l de contenance. Les plantes sont maintenues sous vide (10<sup>4</sup> Pa) pendant 20 mn. Toutes les manipulations des plantes traitées, jusqu'à leur récolte, ont été  
25 effectuées avec des gants en latex. Les plantes traitées ont été plantées dans un nouveau compost, à raison de 54 plantes par bac, puis incubées 2 jours sous un plastique pour prévenir toute déshydratation et pour faciliter l'enracinement. Quatre à six semaines après la plantation, la génération T1 a été récoltée en mélange. Les plants ont été  
30 sélectionnés sur du sable irrigué avec de l'eau contenant de l'herbicide

Basta (5-10 mg/ml phosphinothricine). Deux mois plus tard, les graines T2 ont été récoltées individuellement et conservées pour les analyses ultérieures.

## 5 II – « Kanamycin rescue »

(Bouchez D., Vittorioso P., Courtial B., Camilleri C., 1996. Kanamycin Rescue: A Simple technique for the recovery of T-DNA flanking sequences. *Plant Mol. Biol. Rep.* **14**: 115-123.)

10

### - Extraction de l'ADN génomique

De 0,5 à 0,75g de feuilles sont congelés rapidement dans l'azote liquide, broyés, en présence de polyclar™, en fine poudre dans  
15 un mortier à l'aide d'un pilon, et la poudre est transférée avec l'azote liquide dans un tube "Oak Ridge", dans lequel sont ajoutés 15ml de tampon d'extraction (Tris 100mM, EDTA 50mM, NaC 1500mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 10mM, pH8). Après addition de 1ml de SDS 20%, les tubes sont incubés à 65°C pendant 10mn en agitant toutes les 3 à 4mn.  
20 5ml d'acétate de potassium (5M) sont ajoutés et incubés à 0°C pendant au moins 20mn. Après centrifugation à 25000g (13000rpm) pendant 20mn, le surnageant est filtré à travers un filtre Miracloth (Calbiochem) dans un tube de 30ml contenant 10ml d'isopropanol et incubé à -20°C pendant 30mn. Après centrifugation à 20000g (10000 tpm) pendant  
25 15mn, le culot d'ADN est séché en renversant le tube sur du papier absorbant pendant 10mn. L'ADN est repris dans 0,7ml de TE 50/10 (Tris 50mM, EDTA 10mM pH8) auxquels sont ajoutés 5  $\mu$ l de RNase (5mg/ml) et incubé à 37°C pendant 10mn. L'ADN est extrait par un volume égal de phénol/chloroforme 1/1 et précipité à l'isopropanol

(1volume)/ NaOAc (3M) (1/10 de volume). Le culot d'ADN est séché et repris dans 10µl de TE 10/1 (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH8).

### - Clonage

5

*Première digestion.* 0.5 µg d'ADN génomique d'*Arabidopsis* sont digérés avec PstI (BRL life technologies, 95613, Cergy-Pontoise), précipités à l'éthanol (2.5 volumes)/ NaOAc 3M (1/10 du volume) et remis en suspension dans de l'eau. 2.5 µg du vecteur pResc38 sont digérés par PstI, déphosphorylés avec de la phosphatase alcaline d'intestin de veau (BRL), extraits avec un volume de phénol-chlorophorme (1/1) précipités à l'éthanol/ NaOAc, et remis en suspension dans de l'eau.

10 *Première ligation.* 0.5 µg d'ADN génomique digéré par PstI et 2.5 µg de pResc38 digéré par PstI et déphosphorylé sont mis à liguer dans 100 µl de volume total avec 5 unités de T4 ADN ligase (BRL), toute la nuit à 12°C.

20 *Deuxième digestion.* Le mélange de ligation précédent est précipité à l'éthanol (2.5 volumes)/ NH4OAc 8M (1/2 du volume), remis en suspension dans de l'eau, et complètement digéré avec un deuxième enzyme de restriction : XbaI, dans un volume total de 100 µl en utilisant 20 unités d'enzyme de restriction. Le mélange est précipité à l'éthanol/NH4OAc et mis en suspension dans de l'eau.

25 *Deuxième ligation.* Afin de circulariser les molécules d'ADN, une deuxième ligation est réalisée sur le produit de la deuxième digestion avec une concentration d'ADN plus faible, dans un volume total de 200 µl et en utilisant 5 unités de T4 ADN ligase. Le mélange est incubé toute la nuit à 12°C, puis précipité à l'éthanol/ NH4OAc, rincé 2 fois à l'éthanol 70% (v/v), séché, et repris dans 20 µl d'eau.

30

### **- Transformation**

L'électroporation est réalisée grâce à un appareil de type Gene-Pulser (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) avec un voltage de 1,5 kV.

5 Les cellules electrocompétentes DH10B electromax (BRL) sont rapidement décongelées puis placées sur la glace. Dans une cuvette d'electroporation froide (diamètre interélectrode de 1mm, Bio-Rad), sont mélangés 2 µl du produit de ligation précipité et 40 µl de cellules compétentes. Après électroporation, 1 ml de milieu SOC froid  
10 (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York) est ajouté immédiatement. L'ensemble est transvasé dans un tube de culture de 13 ml et incubé 2h à 37°C sous agitation.

Un volume de 250 µl de culture est étalé sur des boîtes de Pétri  
15 LB-agar contenant 100 mg/l de carbenicilline et 50 mg/l de kanamycine et incubé à 37°C toute la nuit.

### **III – Clonage dans Pbin19**

20 L'insert cloné dans le vecteur P38resc de "Kanamycin rescue" subit un clonage intermédiaire dans le vecteur Bluescript pBKS+ (Stratagène, San Diego CA92121) avant d'être cloné dans le vecteur binaire pBin19 en vue de la transformation des plantes. Ces clonages se font de manière directionnelle par double digestion EcoRI/XbaI.

25 Environ 250 ng de vecteur P38resc contenant l'insert et digéré par EcoRI et XbaI sont ligués avec environ 100 ng de vecteur KS+ digéré par les mêmes enzymes, non déphosphorylé, dans 40 µl de volume final avec 10 U de T4 ADN ligase (BRL). Après incubation une nuit à 12 °C, le mélange de ligation est précipité à l'éthanol/ NH4OAc,  
30 repris dans 10 µl d'eau et utilisé pour électroporer des bactéries NM522

(BRL), rendues électrocompétentes suivant la technique décrite par Sambrook *et al.*, (1989). Les colonies positives blanches sont sélectionnées sur un milieu LB-agar contenant 40 mg/l de XGal, 8 mg/l d'IPTG (Genaxis Biotechnology, 78180, Montigny le Bretonneux) et  
5 100mg/l de carbénicilline.

#### **-Clonage dans pBin19.**

L'insert contenu dans pBKS+, après digestion par EcoRI et  
10 XbaI, est purifié par électroélution à partir d'un gel d'agarose à 1%, selon la technique de Sambrook *et al.*, (1989). Pour le clonage, 100ng de l'insert de 4.3 kb et 100ng de vecteur pBin19 (12 kb) préalablement digéré par EcoRI et XbaI (soit un rapport molaire insert/vecteur de 3/1) sont mélangés dans 40 µl de volume total avec 10 µl de ligase (BRL) et  
15 ligués sur la nuit à 12 °C. Après précipitation à l'éthanol/ NaOAc, le produit de ligation est repris dans 10 µl d'eau et utilisé pour réaliser l'électroporation des bactéries NM522. La sélection des colonies positives se fait sur des boîtes de Pétri avec un milieu LB-agar contenant XGal et IPTG, comme ci-dessus et 50mg/l de kanamycine.

20

#### **IV – Méthode à l'exonucléase III**

(*Current Protocols in Molecular Biology*, éditeurs: F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K.  
25 Struhl; published by Wiley Interscience)

Le fragment d'ADN d'intérêt de 4,3kb a été recloné dans un vecteur pBluescript II KS+ au site EcoRI du polylinker. Ensuite le plasmide de ce clone a été isolé et purifié par la méthode de "Qiagen-Midi-Preparation Tip 100( Qiagen) à partir d'une culture de 30 ml.

Pour pouvoir séquencer dans les deux sens, 5µg plasmide ont été doublement digérés par XhoI/KpnI d'une part et par SpeI/SacI d'autre part, dans un volume de 50 µl chaque fois. (100ng de plasmide linéarisé de chaque digestion a été gardé pour une vérification sur gel d'agarose).

- 5 Le reste du plasmide linéarisé à chaque digestion a été précipité à l'éthanol 95% (3 volumes) et NaOAc 3M (1/5 volume) pendant une heure dans la glace. Après 20 minutes de centrifugation à 13000 tpm et à +4°C, le plasmide digéré de chaque digestion a été rincé avec l'éthanol à 70%, séché au "speed-vac" pendant 5 minutes et repris dans 50µl de
- 10 tampon ExoIII dilué à 1x (0,66M Tris/HCl pH=8,0, 66 mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT, 500µg /ml BSA; USB, United States Biochemicals).

- Pour créer les délétions de chaque côté, 25µl ( 2,5µg ) de chaque digestion ont été préincubés à 37°C pendant 2 minutes, 0,8µl de ExoIII (100u/µl; USB), soit 150unités ExoIII par picomole d'extrémités 3',
- 15 ont été ajoutés et reincubés à 37°C. Toutes les minutes, 3µl (300ng) d'ADN ont été prélevés et placés immédiatement dans la carboglace (=8 prélèvements totaux). Puis 3µl d'eau ont été ajoutés à chaque prélèvement, incubés pendant 10 minutes à 70°C pour inactiver l'enzyme ExoIII. Tous les échantillons ont été placés dans la glace.
- 20 Après addition de 15 µl de tampon de nucléase S1 (300mM Na acétate pH 4,6, 10mM Zn acétate, 50% v/v glycérol) et de 4µl (4 unités) de nucléase S1 (Gibco BRL), ces échantillons ont été incubés pendant 20 minutes à température ambiante. La réaction de la nucléase S1 a été arrêtée en ajoutant 5µl de tampon "stop" (0,3M Tris/HCl pH 8,0, 0,05M
- 25 EDTA) à chaque échantillon. Des fractions aliquotes de 8µl ont été prélevées pour une vérification sur gel d'agarose.

Le volume restant (22µl) de chaque échantillon a été incubé pendant 20 minutes à 37°C après avoir ajouté 2 unités de fragment de Klenow et 1µl de dNTP's à 0,25mM.

- 30 Enfin les molécules délétées ont été recircularisées en ajoutant 1µl (1 unité) de T<sub>4</sub>DNA ligase (USB), 3µl de tampon 10x (660mM

Tris/HCl pH=7,6, 66mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM DTT, 660µm ATP) et 2µl d'eau à chaque échantillon. Les ligations ont été faites dans un volume total de 30 µl et incubées à 16 °C pendant la nuit.

Puis un tiers du volume (10µl) des produits issus de chaque  
5 ligation a été utilisé pour transformer 100µl de cellules compétentes *E.coli* DH5α par la méthode au Chlorure de Calcium ( Current Protocols in Molecular Biology, éditeurs: F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl,; published by Wiley Interscience ) . Les cellules transformées de *E. coli* DH5α ont été  
10 sélectionnées sur LB-agar contenant de la carbénicilline à 100mg/l , 40 mg/l de XGal et 8 mg/l d'IPTG.

#### V – Extraction des ARN totaux

15 (Heim U., Weber H., Bäumllein H., Wobus U., 1993. A sucrose-synthase gene of *Vicia faba* L.: expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation. *Planta* **191**: 3494-501)

20 Les tissus frais congelés (plantule ~2g et racine ~1g) ont été écrasés dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et un pilon. Puis 500µl de tampon d'extraction (1M Tris/HCl pH 7,4 , 1% SDS , 5mM EDTA) pour 200mg tissu ont été ajoutés goutte à goutte, puis le même volume de phenol/chloroforme/isoamylalcohol, tout en continuant le broyage  
25 jusqu'a obtenir une poudre lisse. Après décongélation, chaque solution a été transférée dans un tube et centrifugée pendant 5 minutes à +4°C .

Chaque phase aqueuse a été réextraite deux fois avec le même volume de phénol/chloroforme/isoamylalcohol et précipitée à l'éthanol (3 volumes) / NaOAC ( 1/10 volume) pendant une heure à -80°C. Après  
30 centrifugation pendant 30 minutes à +4°C, chaque culot a été séché

brièvement et dissous dans de l'eau+DEPC . Une deuxième centrifugation pendant 10 minutes à +4°C a été faite et chaque surnageant a été mélangé avec le même volume de LiCl à 4M pour une précipitation des acides ribonucléiques dans la glace à +4°C pendant la  
5 nuit.

Ensuite chaque solution a été centrifugée pendant 15 minutes et les culots d'ARN ont été lavés deux fois dans LiCl 2M et une fois dans de l'éthanol à 70% . Après un séchage au "speed-vac", chaque culot d'ARN a été dissous dans de l'eau+DEPC et la concentration d'ARN a  
10 été vérifiée par spectrophotométrie.

## VI – Test GUS

(Jefferson R. A., 1987. Assaying chimeric genes in plants: the *gus* gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387.)  
15

### – Par histochimie

Quinze jours après la germination des transformants d'*Arabidopsis*, l'activité GUS est testée grâce à l'acide X-glucuronique (X-Glu, Biosynth G. Staad, Suisse) comme décrit par Jefferson *et al.*,  
20 modifié par l'utilisation de 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 mM de catalyseur K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> et 0.4 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. Aucun bruit de fond n'a été observé dans les tissus des plantes non transformées.



### **– Par fluorimétrie**

Les échantillons de plantes (racines ou feuilles) sont broyés en tube Eppendorf™ avec 200 µl de tampon d'extraction ( 50mM NaPO<sub>4</sub>, 10 mM dithiothreitol, 10 mM EDTA, pH7) et une pincée de sable de Fontainebleau. Après centrifugation deux fois 10 min à 13000tpm à 4°C, le dosage d'activité GUS est réalisé sur le surnageant, dans 150µl de volume final contenant le substrat MUG (4-Methyl-β-D-glucuronide d'ombellifère, Sigma) à concentration finale de 3 mM.

Après 15 min d'incubation à 37°C, l'activité GUS est mesurée grâce à un appareil Fluoroskan II ( Labsystems, 91944 Les Ulis, France) avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 365 nm et 455 nm, respectivement.

Les concentrations de protéines dans les extraits de plantes sont mesurées en utilisant le réactif de Bradford (Biorad).

Les concentrations d'ADN sont mesurées en utilisant le réactif de Hoechst (Sigma). La réaction se fait dans 200 µl de volume final (tampon Labarca-Paigen : 50 mM NaPO<sub>4</sub>, NaCl 2M, EDTA 2mM, pH 7.5) contenant le réactif de Hoechst à 0.5 mg/ml.

### **EXEMPLE 1: Isolement d'une séquence nucléotidique d'environ 2,2 kb par piégeage de promoteur.**

Une collection de transformants d'*Arabidopsis thaliana* (écotype WS) a été obtenue selon la technique décrite par Bechtold *et al.* (1993).

Les plantes ont été transformées par insertion aléatoire dans leur génome d'un ADN de transfert (ADN-T) transmis par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*.

Cet ADN de transfert comporte un gène *gus* sans promoteur tel que décrit par Bouchez *et al.* (1993, C.R.A.S. Paris, volume 316:1188-1193).

La méthode de transformation *in planta* a été choisie et mise au point à la Station Génétique de Versailles de l'Institut National de la Recherche Agronomique selon la méthode décrite par Bechtold *et al.* (1993, C.R.A.S. Paris, volume 316:1194-1199). Cette méthode permet  
5 d'obtenir rapidement un nombre élevé de transformants indépendants comportant un nombre limité d'insertions (1,5 insertions par transformant en moyenne).

Un criblage de l'expression du gène GUS par histochimie parmi les transformants selon la méthode décrite par Mollier *et al.* (1995,  
10 C.R.A.S. Paris, volume 318: 465-474) a permis d'isoler un transformant présentant une activité GUS particulière:

- expression très forte spécifiquement dans la racine, et ce tout au long du développement, comme montré dans les clichés  
15 correspondant à la figure 3a-c. La racine est colorée sur toute la longueur sauf la zone d'élongation (figure 3d).

- expression dans toutes les assises cellulaires de la racine (épiderme, cortex, endoderme, péricycle, vaisseau conducteur) telle que  
20 cela peut être observé sur le cliché de la figure 4.

Ce transformant a été caractérisé plus avant par la technique de Southern blot (Southern E.M., 1975).

25 Une séquence d'environ 2,2 kb située en amont de la bordure droite de l'insertion, correspondant au promoteur, a été clonée par la technique de « Kanamycin Rescue » selon la technique décrite par Bouchez *et al.* (1996, Plant Mol. Biol. Rep. vol.14:115-123).

Le vecteur de « Kanamycin rescue » est représenté en figure 7.  
30

#### **EXEMPLE 2 : Recherche de la séquence complète du promoteur selon l'invention.**

Le fragment d'ADN de 2,2 kb a été utilisé comme sonde pour  
35 rechercher le promoteur entier dans une banque d'ADN génomique

d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype Columbia (J.T. Mulligan, Stanford CA 94305).

Deux phages d'environ 15 kb ont été sélectionnés (clones lr1 et lr2).. Ces deux clones de phages comportaient un insert correspondant à un fragment génomique de 4,413 kb (SEQ ID N°3) et contenant la séquence de la sonde. L'insert de ces deux phages a été entièrement séquencé par la méthode à l'exonucléase III décrite par Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, éditeurs. F.M. AUSUBEL, R. BRENT., R.E. KINGSTON, D.D. MOORE, J.G. SEIDMAN, J.A. SMITH, K. STRUHL; published by Wiley Interscience). Il s'agit de la séquence SEQ ID N°3 . Le début de la séquence correspondant à l'ADN-T est localisé à partir du nucléotide en position 2285 de la séquence SEQ ID N°3.

L'expression spécifique du gène gus a été mise en évidence par des expériences de Northern blot sur des ARN totaux extraits de transformants homozygotes pour l'insertion.

Les résultats d'une expérience de Northern blot sont représentés à la figure 5.

Un transcrit d'environ 2 kb est mis en évidence sur les ARN de racine et n'est pas détectable sur les ARN des parties aériennes (figure 5).

Les ARN totaux ont été extraits de racines et de parties aériennes de la lignée transformée selon la méthode décrite par Heim *et al.* (1993, Planta, vol. 191: 3.494, 3501).

En vue de mettre en évidence un éventuel transcrit endogène correspondant au promoteur, des gels de Northern ont été réalisés sur des ARN totaux extraits de plantes non transformées, et hybridées avec le fragment génomique de 4,413 kb (SEQ ID N°3) qui contient environ 2,2 kb en aval du promoteur.

Aucun transcrit n'a été détecté avec cette sonde.

En outre, deux banques d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* indépendantes (une banque d'ADNc de racines et une banque d'ADNc de plantes entières) ont été criblées avec cette même sonde de 4,413 kb.

A nouveau, les résultats ont été négatifs et aucun ADNc correspondant au promoteur n'a été trouvé.

Enfin, aucune phase codante n'a pu être mise en évidence en aval du promoteur en utilisant les logiciels classiques de prédiction.

5 Logiciels Net Plant Gene et Net Gene 2:

S.M. Hebsgaard et al.(1996).

Brunak S. et al. (1991).

Logiciel Genscan:

Burge, C. et al. (1997);

10 Burge, C.B. (1998).

La séquence de 4,413 kb (SEQ ID N°3) est très riche en bases A et T (68% de A et de T) et comporte 67 motifs ATG, 20 motifs CAAT, 38 motifs TATA, 9 motifs TATAAT et 2 boîtes Cr.

15 Les résultats obtenus indiquent qu'aucun transcrit n'est décelable en aval du promoteur étudié. Il s'agirait donc d'un promoteur cryptique.

### **EXEMPLE 3: Mise en évidence de l'activité promotrice.**

20

L'activité promotrice a été démontrée en réalisant une retransformation *in planta* d'*Arabidopsis thaliana* (écotype WS) par ce promoteur de 2,2 kb placé en amont du gène rapporteur *gus*.

25 Pour cette expérience, la construction suivante a été réalisée, qui est représentée sur la figure 2: un fragment d'environ 4,27 kb compris entre les sites XbaI et EcoRI du vecteur de « kanamycin Rescue » (cf. figure 7) a été cloné dans l'ADN-T du vecteur pBin19 selon la technique décrite par Bevan M. (1984, Nucleic Acid Research vol.12: 8711-8721).

30 Ce fragment d'ADN de 4,27 kb est inclus dans la séquence SEQ ID N°4, cette séquence comprenant également un polysite de clonage du vecteur P38, comme décrit ci-après.

Il comporte: les sites de clonage de P38: XbaI, SpeI, BamHI, SmaI, PstI (nct 1 à 29), la séquence promotrice SEQ ID N°1 (nct 30 à

2178) et la séquence du gène *gus* de l'ADN-T de PGKB5 jusqu'au site EcoRI (nct 2179-4309).

5 **EXEMPLE 4: Transformation de plantes d'*Arabidopsis thaliana***  
**avec la construction contenant le gène *gus* placé sous le contrôle**  
**du promoteur.**

Des plantes d'*Arabidopsis thaliana* ont été transformées via  
*Agrobacterium tumefaciens* avec la construction 1 décrite dans la figure  
10 2 et neuf transformants individuels ont été étudiés pour l'expression du  
gène *gus*, d'abord en histochimie.

L'expression du gène *gus* a également été quantifiée par  
dosage fluorimétrique selon la technique décrite par Jefferson (1987,  
15 Plant, Mol. Biol. Rep. volume 5: 387), modifiée par l'utilisation de 5mM  
de substrat dans les racines d'une part, et dans les parties aériennes  
(cotylédons, feuilles, tiges), d'autre part, et ce, à plusieurs stades du  
développement des plantes.

L'activité du gène *gus* des neuf transformants a été comparée à  
20 celle du transformant initial.

Les résultats sont représentés sur le tableau I ci-après.

Pour le transformant de départ ACC<sub>6</sub>H, à l'état homozygote, ou  
ACC<sub>6</sub>T<sub>3</sub>, en ségrégation, l'activité du gène *gus* dans les racines diminue  
avec l'âge de la plante, alors qu'une faible activité dans les parties  
25 aériennes devient détectable en fin de développement.

Pour 6 des 9 transformants étudiés (transformants 6i, 6h, 6-1,  
6-2, 6-3 et 6a) l'activité du gène *gus* dans les racines est encore plus  
forte que dans celle du transformant de départ (4 à dix fois ) et l'activité  
dans les feuilles devient plus facilement détectable.

30 Cependant, le rapport activité du gène *gus* dans les  
racines/activité du gène *gus* dans la feuille reste constant.

Pour ces transformants, la spécificité racinaire est donc  
inchangée par rapport au transformant de départ. Seul le niveau  
d'expression du gène *gus* est globalement plus élevé.

Pour 3 des transformants (6b, 2b et 6k) le rapport activité du gène *gus* dans la racine/activité du gène *gus* dans la feuille est plus faible que dans le transformant de départ; l'expression du gène *gus* est donc moins spécifique des racines pour ces transformants.

5 La diminution de l'activité GUS dans les racines au cours du développement est illustrée en figure 6, pour le transformant initial (a) et deux transformants caractéristiques (b et c). Pour le transformant initial, l'activité dans les feuilles n'est pas détectable. Pour le transformant 6-1, elle est faiblement détectable, et le rapport activité GUS racine/feuille est  
10 le même que pour le transformant initial. Pour le transformant 2b par contre, l'activité GUS dans les feuilles est plus élevée, et le rapport racine/feuille est nettement diminué.

#### 15 **EXEMPLE 5 : Etude de délétions du promoteur selon l'invention**

Des délétions du promoteur ont été obtenues selon la méthode à l'exonucléase III décrite dans la partie Matériels et Méthodes (Section IV) afin d'obtenir des fragments fonctionnels du promoteur.

#### 20 ***Digestion du fragment génomique à l'aide de l'exonucléase III***

En premier lieu, le fragment génomique de 4.3 kb (sequence SEQ ID N° 3) a été cloné dans un vecteur pBluescript KS+, au site EcoRI, puis a subi des digestions partielles en 5' par l'exonucléase III.

25 Clonage des fragments obtenus dans un vecteur d'expression fonctionnel chez les plantes

Afin de tester l'activité promotrice des fragments délétés du promoteur, les fragments obtenus après digestion enzymatique à l'aide de l'exonucléase III dans le vecteur pBluescript KS+, ont été amplifiés  
30 puis clonés dans un vecteur possédant le gène *gus*.

Les fragments du promoteur sont amplifiés par PCR à l'aide de 2 amorces portant des sites enzymatiques, respectivement:

- en 5' du promoteur, on utilise l'amorce T7-HindIII, située dans le vecteur KS+ ;

- en 3' du promoteur, on utilise une amorce choisie dans la séquence génomique de 4.3kb et portant un site BamHI:

5

Il s'agit des amorces suivantes :

a) amorce T7-HindIII, en 5': GGC AAG CTT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C (SEQ ID N°6), qui possède la séquence "AAGCTT" reconnue par l'endonuclease de restriction Hind III.

10

b) amorce en 3': CTA GGG ATC CAG CCA TTC CCT ATG C (SEQ ID N°7), qui possède la séquence "GGATC/C" reconnue par l'endonuclease de restriction BamHI. La séquence de cette amorce située du côté 5', par rapport au site BamHI est complémentaire de la séquence allant du nucléotide en position 2400 jusqu'au nucléotide en position 2386 de la séquence SEQ ID N°3.

15

### ***Protocole d'amplification par PCR***

Sont mélangés pour chaque échantillon:

- 20 40 µl d'H<sub>2</sub>O  
5 µl tampon PCR 10x  
1 µl dNTP 10 mM  
1 µl enzyme pfu-turbo DNA polymérase (à 2.5 u/µl, Stratagène)  
1 µl d'amorce T7-Hind III ( à 10 mM)  
25 1 µl d'amorce 4.4-BamHI ( à 10 mM)  
1 µl d'ADN matrice (10 ng d'ADN du clone d'exonuclease choisi)

### ***Réaction PCR ::***

L'amplification proprement dite est réalisée dans les conditions  
30 suivantes :

a) Etape de dénaturation pour l'obtention de fragments d'ADN simple brin à 94°C pendant 4 minutes ;

b) Trente cycles d'amplifications réalisés dans les conditions suivantes :

- 5       - dénaturation à 94°C pendant 30 secondes ;
- hybridation des amorces à 50°C pendant 45 secondes ;
- élongation des amorces à 72°C pendant 3 minutes

c) Dernière étape d'élongation réalisée à 72°C pendant 10 minutes.

10       Les fragments de promoteur ainsi amplifiés comportent donc les sites Hind III, du côté 5', et BamHI, du côté 3'.

          Les fragments amplifiés sont ensuite clonés au niveau des sites Hind III et BamHI, donc de façon orientée, dans le vecteur pC-*gus* dont la carte détaillée est représentée à la Figure 10. Le clonage a été réalisé  
15       conformément à la technique décrite dans la partie Matériels et Méthodes (Section III) pour le vecteur pBin19.

Les fragments clonés en amont du gène *gus* dans le vecteur pC-*gus* sont: les suivants :

- 20       - Le fragment allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3 ;

          Le fragment allant du nucléotide en position 493 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3 ;

- 25       Le fragment allant du nucléotide en position 1076 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3 ;

          Le fragment allant du nucléotide en position 1976 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3 ;

          Le fragment allant du nucléotide en position 2040 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3 ;



***Transformation de cellules d'Agrobacterium tumefaciens  
avec les vecteurs recombinants contenant divers fragments du  
promoteur selon l'invention***

5 Les vecteurs pC-*gus* contenant les différents inserts sont ensuite transférés dans la souche d'Agrobactérie et des plantes d'*Arabidopsis* WS sont transformées conformément au protocole décrit à la Section I de la partie Matériels et Méthodes.

10 Les graines des transformants primaires sont sélectionnées sur un milieu sélectif contenant de l'hygromycine (30 mg/l).

La descendance de 20 transformants primaires par construction est semée sur milieu hygromycine afin de sélectionner les transformants possédant un seul locus d'insertion de l'ADN-T de *Agrobacterium*  
15 *tumefaciens*. Les homozygotes de ces transformants sont étudiés pour l'expression de la protéine GUS dans les racines et dans les feuilles, à la fois qualitativement par histochimie et quantitativement par fluorimétrie, conformément aux protocoles décrits dans la Section VI de la partie Matériels et Méthodes.

TABLEAU 1

	Jour 12			Jour 19			Jour 26			Jour 33		
Transfor- mant	racine	feuille	rapport racine/ feuille	racine	feuille	rapport	racine	feuille	rapport	racine	feuille	rapport
ACC6H	4,06	0,02		4,19	0,09	47	1,55	0,05	31	2,07	0,19	11
ACC6T3	4,39	0,02		3,98	0,09	44	1,3	0,04	33	2,44	0,25	10
6i	16,42	0,05		12	0,25	48	4,93	0,12	41	8,74	0,57	15
6h	25,87	1,39	19	4,94	0,17	29	4	0,27	15	4,64	0,32	15
6.1	32,05	1,01	32	22	0,6	37	7,9	0,56	14	10,3	0,51	20
6.3	40,61	1,84	22	7,75	0,45	17	21,68	0,73	30	3,97	0,34	12
6.2	48,87	1,61	30	6,49	0,17	38	22,01	1,01	22	4,55	0,79	6
6a	6,93	0,14	50	1,4	0,01	140	1	0,27	25	1,48	0,07	21
6b	8,62	0,73	12	5,43	0,78	7	2,35	0,26	9	2,63	0,19	14
2b	33,02	4,91	7	4,93	1,31	4	3,69	1,3	3	2,8	0,77	4
6k	107,93	11,57	9	32,3	3,09	10	11,74	3,65	3	6,6	1,75	4
WS	-0,06	0,33		0,1	0,07		-0,01	0		-0,04	0,01	

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:**

- 5 • F.M. AUSUBEL, R. BRENT, R.E. KINGSTON, D.D. MOORE, J.G. SEIDMAN, J.A. SMITH, K. STRUHL; 1989, Current Protocols in Molecular Biology published by Wiley Interscience.
  
- 10 • BASTOLA, D.R., PETHE, V.V. and WINICOV, I. (1998). Alfin 1 , a novel zinc finger protein in alfalfa roots that binds to promoter elements in the salt inducible MSPRP2 gene, Plant. Mol. Biol. 38, 1123-1135).
  
- 15 • BECHTOLD N. , Ellis J. PELLETIER G., 1993. *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C.R. Acad. Sci. Paris 316: 1194-1199.
  
- 20 • BOUCHEZ D., CAMILLERI C., CABOCHE M. 1993. A binary vector based on Basta resistance for *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. C.R. Acad. Sci. Paris 316: 1188-1193.
  
- 25 • BEVAN M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucleic Acid Research 12: 8711-21.
  
- 30 • BRUNAK S. ENGELBRECHT, J. and KNUDSEN, S.: Prediction of human mRNA Donor and Acceptor Sites from the DNA sequence. Journal of Molecular Biology, (1991), 220, 49-65.
  
- 35 • BURGE, C. and KARLIN, S. (1997). Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. J. Mol. Biol. 268, 78-94, BURGE,

C.B. (1998). Modeling dependencies in pre-mRNA splicing signals. In SALZBERG, S. SEARLS, D. and KASIF, S. eds. Computational methods in molecular biology. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 127-163.

5

• BOUCHEZ D. , VITTORIOSO P., COURTIAL B. CAMILLERI C., 1996. Kanamycin Rescue: A simple technique for the recovery of T-DNA flanking sequences. Plant Mol. Biol. Rep. 14: 115-123.

10

• BOUCHEZ D. CAMILLERI C., CABOCHE M. , 1993. A binary vector based on Basta resistance for *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. C.R. Acad. Sci. Paris 316: 1188-1193.

15

• CRAWFORD, N.M. and GLASS, A.D.M. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. Trends in Plant Science, 3, 389-395.

20

• CORMACK , B.P. VALDIVIA, R.H. FALKOW, S. (1996), FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP) Gene 173: 33-38.

25

• JEFFERSON R. A., 1987. Assaying chimeric genes in plants: the Gus gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep.5: 387.

30

• HEBSGAARD S.M., P.G. KORMING, N. TOLSTRUP, J. ENGELBRECHT, P. ROUZE, S. BRUNAK: Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* DNA by combining local and global sequence information. Nucleic Acids Research, (1996), Vol.24, N°17, 3439-3452.

35

- 5     • HEIM U. WEBER H., BAUMLEIN H. WOBUS U. 1993. A sucrose-synthase gene of *Vicia faba* L. Expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation. *Planta* 191: 3494-501.
  
- 10    • HESSE, H. SONNEWALD, K. and WILLNITZER, L. (1995). Cloning and expression analysis of sucrose-phosphate synthase from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Mol. Gen. Genet, 247, 515-520).
  
- 15    • HWANG et al., (1995). An *Arabidopsis thaliana* root specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA, and NaCl. Plant J.8: 37-43.
  
- 20    • HWANG I., GOODMAN, H.M. (1995). An *Arabidopsis thaliana* root specific kinase homolog is induced by deshydration, ABA, and NaCl, The Plant Journal, 8, 37-43).
  
- 25    • LEAH, R. TOMMERUP, H. SVENDSEN, I. and MUNDY, Y. (1991). Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties . J. Biol. Chem. 266, 1464-1573).
  
- 30    • MALAMY, Y.E., BENFEY, P.N. (1997). Analysis of *scarecrow* expression using a rapid system for assessing transgene expression in *Arabidopsis* roots. Plant Y. 12: 957-963.
  
- 35    • MOLLIER P., MONTORO P., DELARUE M. BECHTOLD N. BELLINI C., PELLETIER G., 1995. Promoterless gus A expression in a large number of *Arabidopsis thaliana* transformants obtained by *in planta* infiltration method. C.R. Acad. Sci. Paris 318: 465-474.

- SOUTHERN , E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-577.
- 5
- WINICOV, DEUTCH, C.E. (1994). Characterization of a CDNA clone from salt tolerant alfalfa cells that identifies salt-inducible root specific transcripts) J. Plant. Physiol. 144, 222-228).
- 10
- YANG T.T. CHENG, L. KAIN, S.R. (1996) Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. Nucleic Acids Res. 24: 4592-4593.

## REVENDICATIONS

1. Acide nucléique comprenant tout ou partie d'un promoteur végétal capable de diriger l'expression d'une séquence nucléotidique d'intérêt dans les cellules de la racine d'une plante, durant la totalité du développement de cette dernière caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'un polynucléotide possédant au moins 80 % d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N° 1, ou un acide nucléique de séquence complémentaire, à l'exception de la séquence référencée sous le N°AC 007 289 dans la base de donnée EMBL.

10

2. Acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'un polynucléotide hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°1, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

15

3. Acide nucléique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend l'une des séquences suivantes:

- 20 - le polynucléotide allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3;
- le polynucléotide allant du nucléotide en position 493 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3;
- le polynucléotide allant du nucléotide en position 1076
- 25 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3;
- le polynucléotide allant du nucléotide en position 1976 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3; et
- le polynucléotide allant du nucléotide en position 2040 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3.

30

4. Acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du promoteur végétal.

5 5. Acide nucléique selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il s'agit de la séquence nucléotidique SEQ ID N° 2.

6. Acide nucléique selon la revendication 4, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique d'intérêt est choisie parmi les séquences  
10 codantes de gènes interagissant avec des parasites ou des pathogènes, les séquences codant les endochitinasés, les séquences codant pour des protéines de protection de la plante au stress hydrique ou salin, ou encore des gènes agissant sur la teneur en sucre de la plante ou sur le transport de nitrate.

15 7. Acide nucléique comprenant 10 à 2000 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, utile comme sonde ou amorce nucléotidique.

20 8. Vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7.

9. Vecteur recombinant selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les vecteurs Pbin19, 101, pBi221, pBi121 et pC-  
25 gus.

10. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur contenu dans la souche d'*E. Coli* déposée à la CNCM le 25 Mai 1999 sous le Numéro d'accès I-2218.

30



11. Cellule hôte recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7 ou un vecteur recombinant selon l'une des revendications 8 à 10.

5 12. Cellule hôte recombinante selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est d'origine bactérienne ou végétale.

13. Cellule hôte recombinante selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule d'*Agrobacterium tumefaciens*.

10

14. Cellule hôte recombinante selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de la souche d'*E. Coli* déposée à la CNCM le 25 Mai 1999 sous le Numéro d'accès I-2218.

15 15. Organisme multicellulaire végétal recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend une cellule hôte recombinante selon l'une des revendications 11 à 13.

16. Plante transgénique comprenant, sous une forme intégrée  
20 dans son génome, un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7.

17. Plante transgénique selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un colza, d'un tabac ou d'un maïs.

25

18. Procédé d'obtention d'une plante transgénique caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) Obtention d'une cellule hôte recombinante végétale selon  
30 l'une des revendications 11 ou 12 ;

b) Régénération d'une plante entière à partir de la cellule hôte recombinante obtenue à l'étape a).

5                   c) Sélection des plantes obtenues à l'étape b) ayant intégré la séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur végétal.

19. Procédé d'obtention d'une plante transgénique caractérisé  
10   en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) Obtention d'une cellule hôte recombinante d'*Agrobacterium tumefaciens* selon la revendication 13 ;

15                   b) Transformation de la plante d'intérêt par infection avec la cellule hôte recombinante obtenue à l'étape a).

                  c) Sélection des plantes ayant intégré la séquence  
nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide  
20   promoteur végétal.

20. Procédé d'obtention d'une plante transgénique caractérisé  
en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

25                   a) transfecter une cellule de plante avec un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7 ou un vecteur recombinant selon l'une des revendications 8 à 10;

                  b) régénération d'une plante entière à partir des cellules de  
30   plantes recombinantes obtenues à l'étape a) ;

c) sélection des plantes ayant intégré la séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur végétal.

5           21. Procédé d'obtention d'une plante transgénique selon l'une des revendications 18 à 20, caractérisé en ce qu'il comporte en outre les étapes de :

d) croisement entre elles de deux plantes transgéniques telles qu'obtenues à l'étape c) ;

10

e) sélection des plantes homozygotes pour le transgène.

15           22. Procédé d'obtention d'une plante transgénique selon l'une des revendications 18 à 20, caractérisé en ce qu'il comporte en outre les étapes de:

d) croisement d'une plante transgénique obtenue à l'étape c) avec une plante de la même espèce ;

e) sélection des plantes issues du croisement de l'étape d) ayant conservé le transgène.

20

23. Plante transgénique, telle qu'obtenue selon le procédé selon l'une des revendications 18 à 22.

25           24. Semence de plante dont les cellules constitutives comprennent dans leur génome un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7.

25. Semence d'une plante transgénique selon l'une des revendications 16, 17 et 23.

1/22

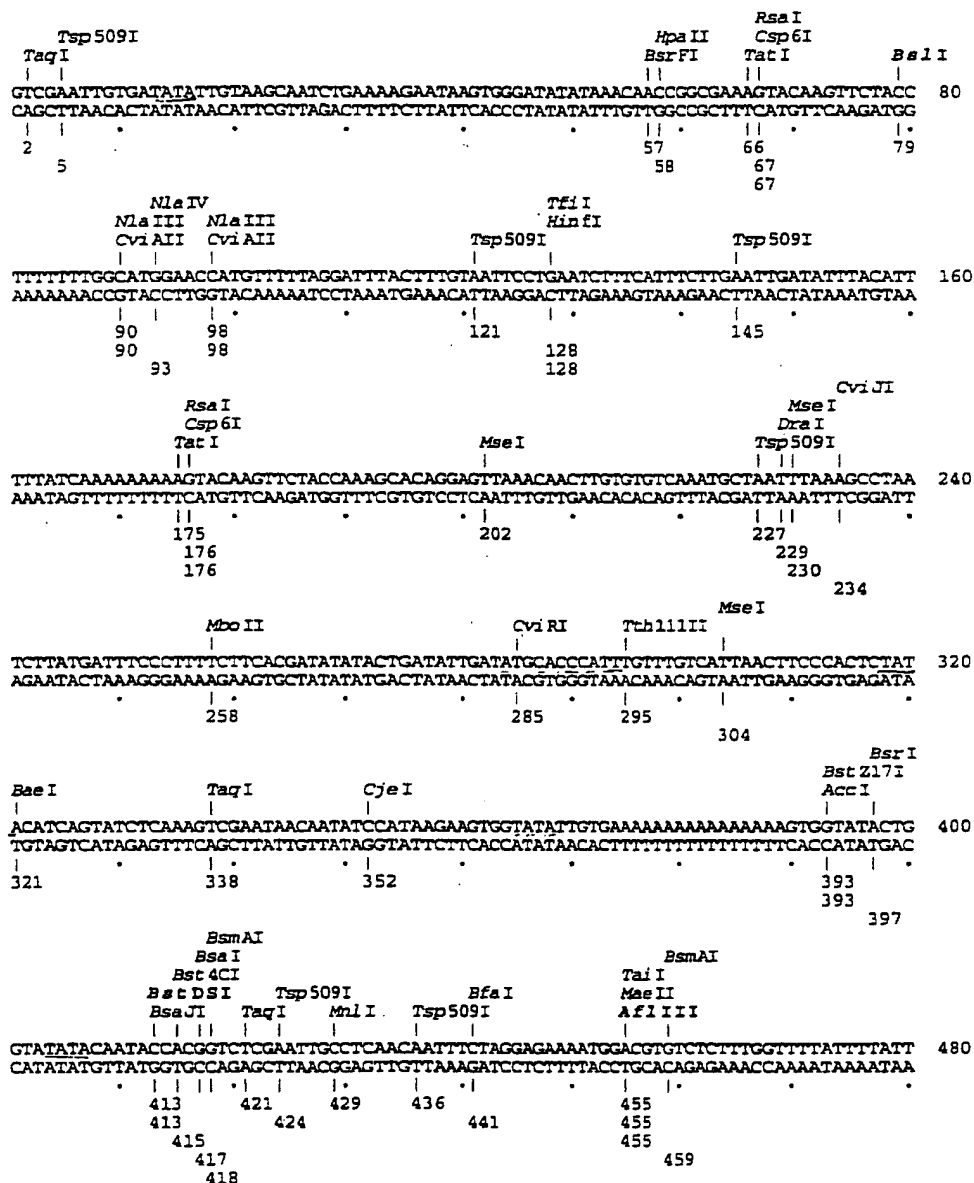


Figure 1 (1)

2/22

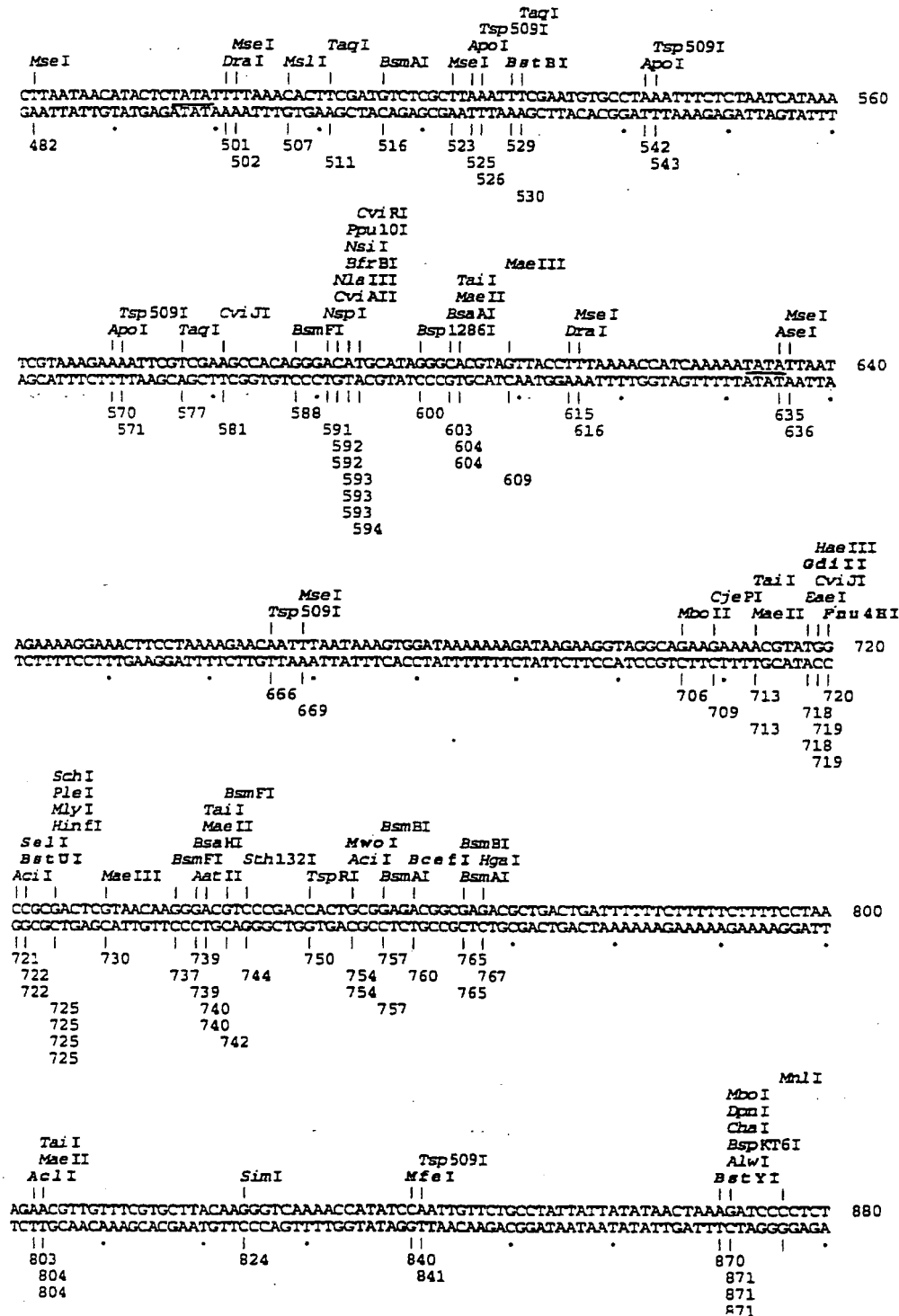


Figure 1(2)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

3/22

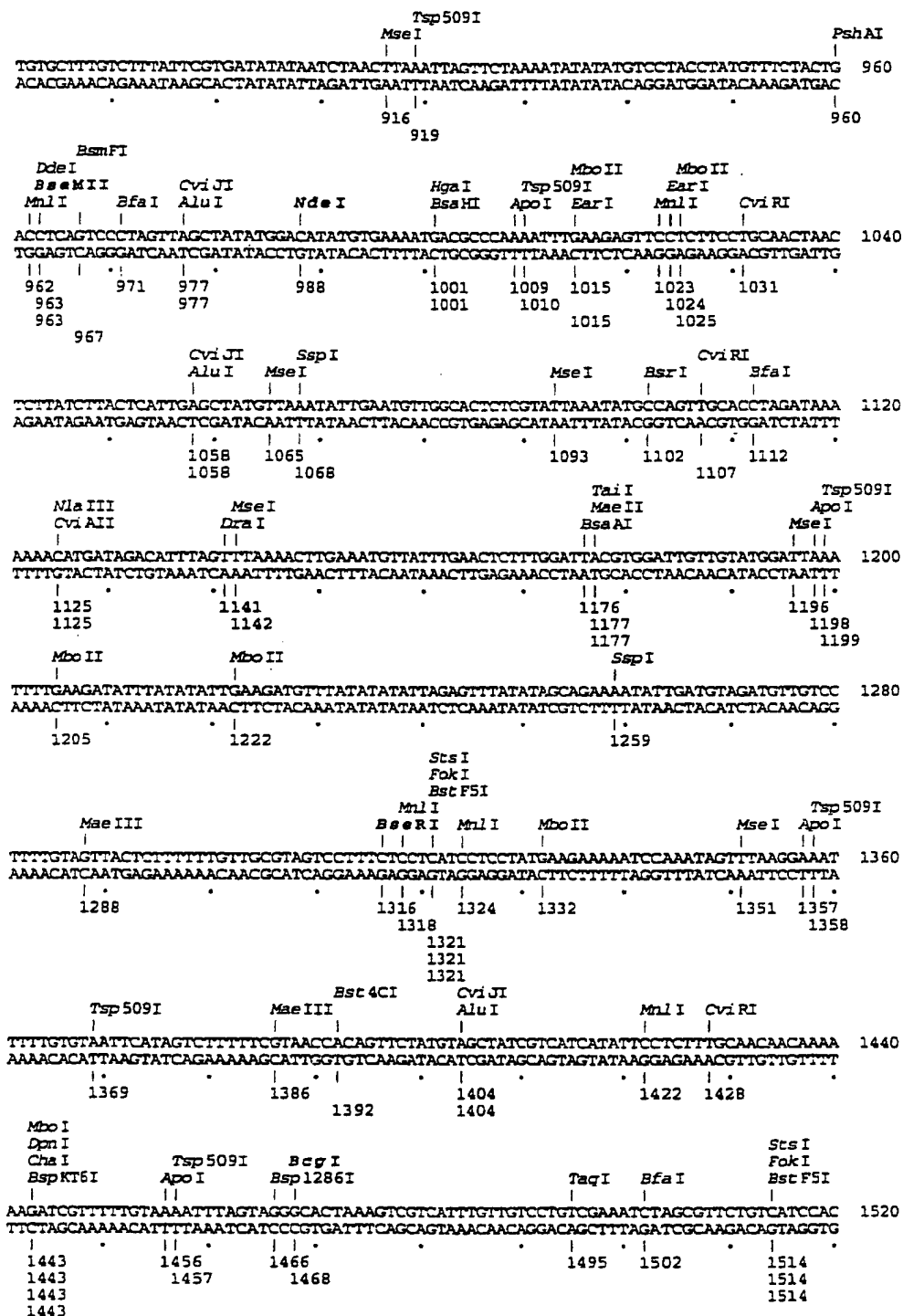


Figure 1 (3)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

4/22

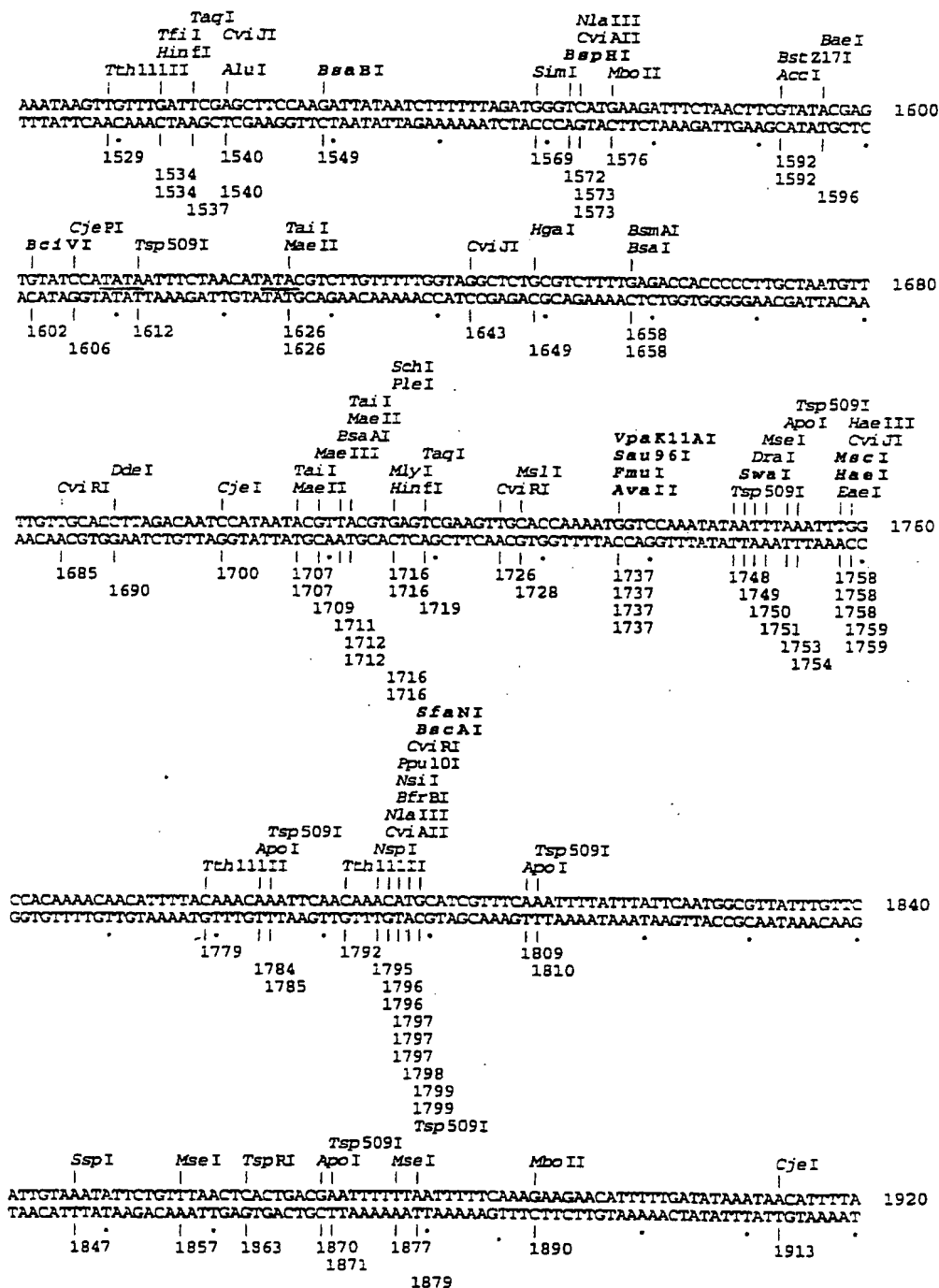


Figure 1 (4)

5/22

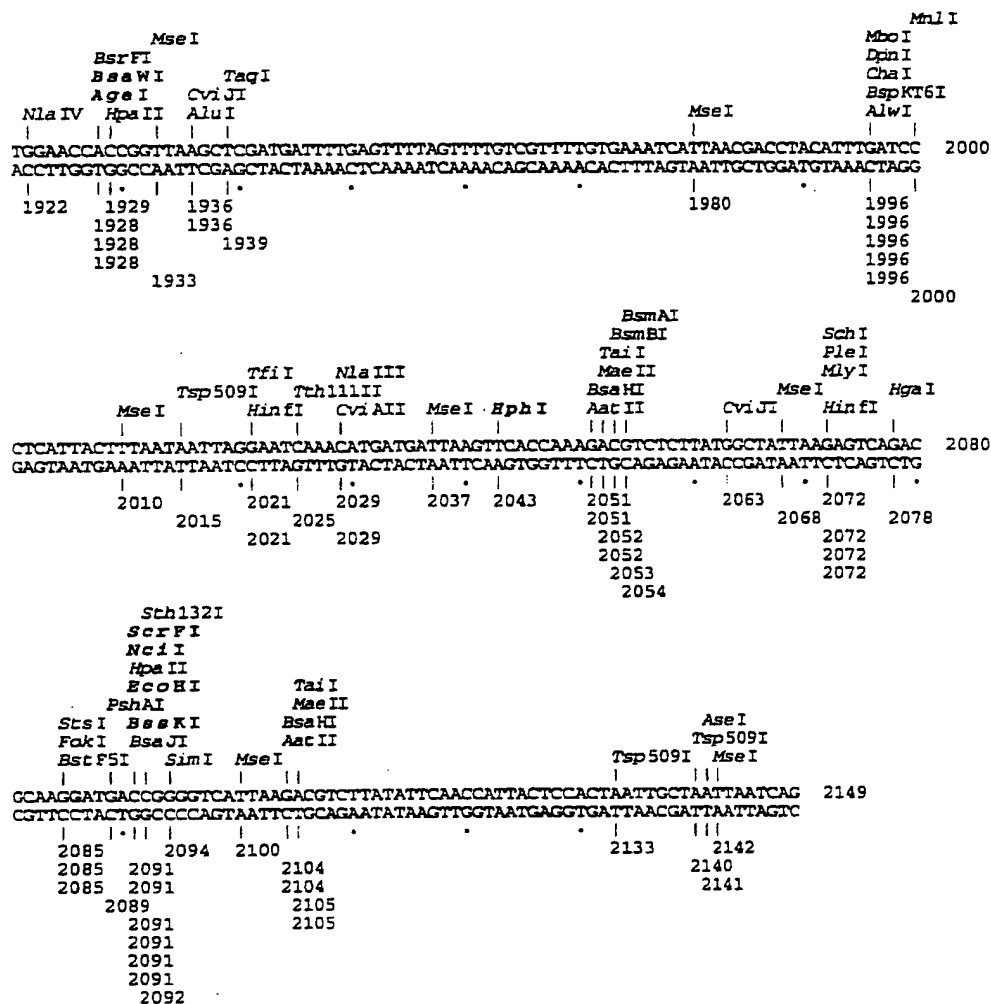


Figure 1(5)



6/22

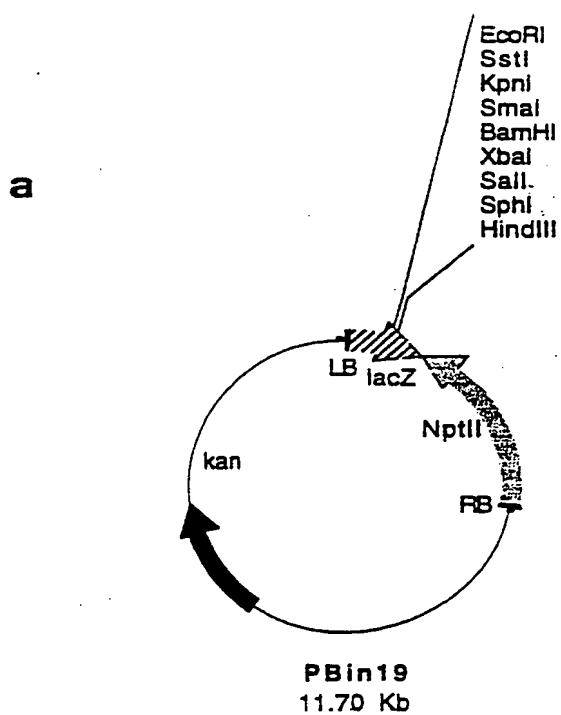
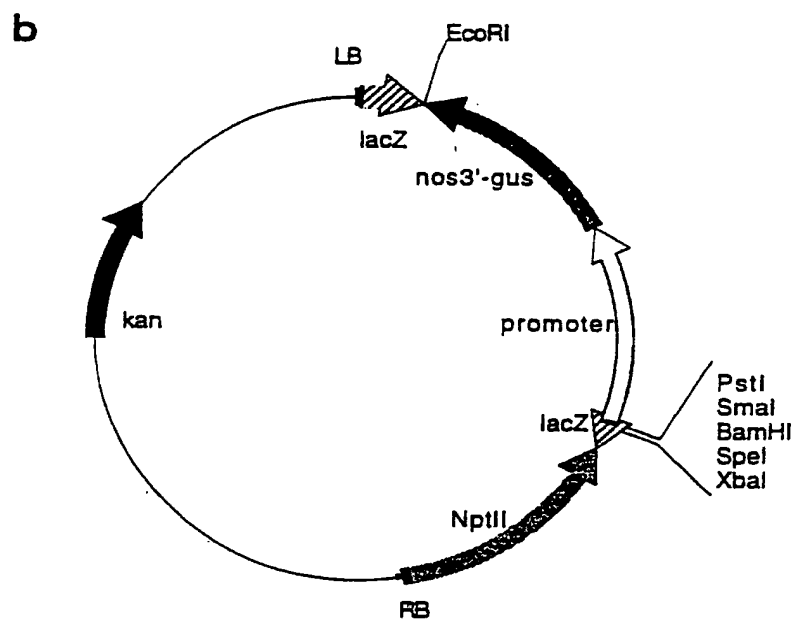


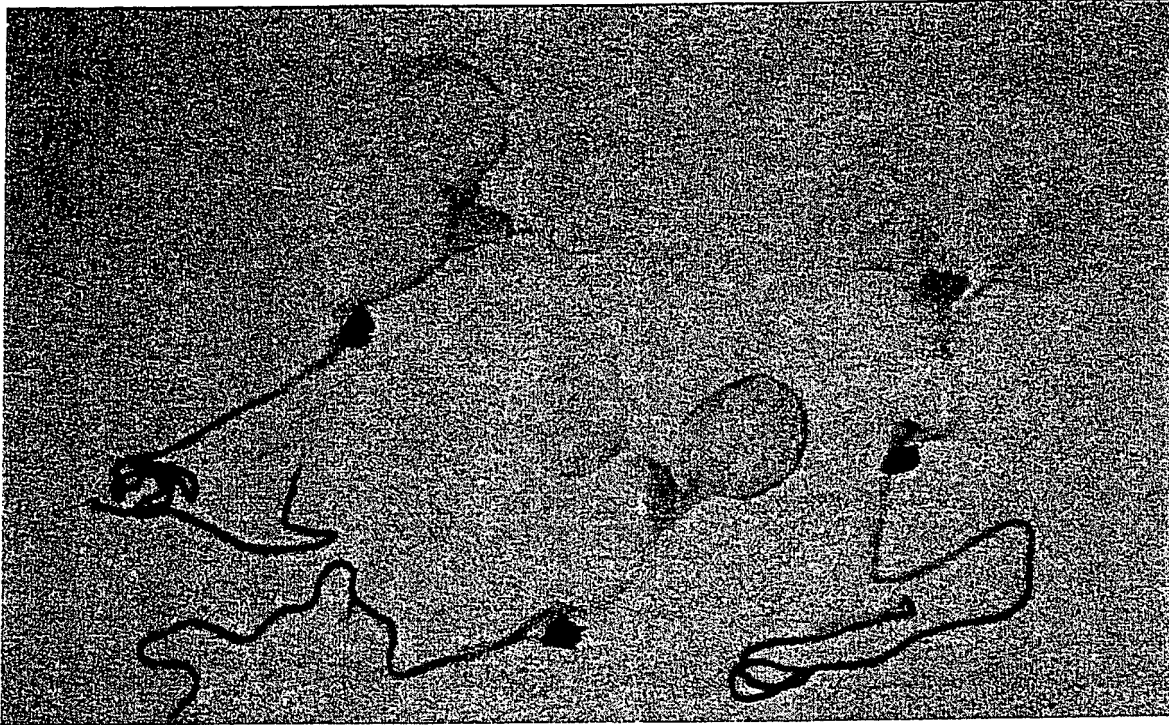
Figure 2 (a)

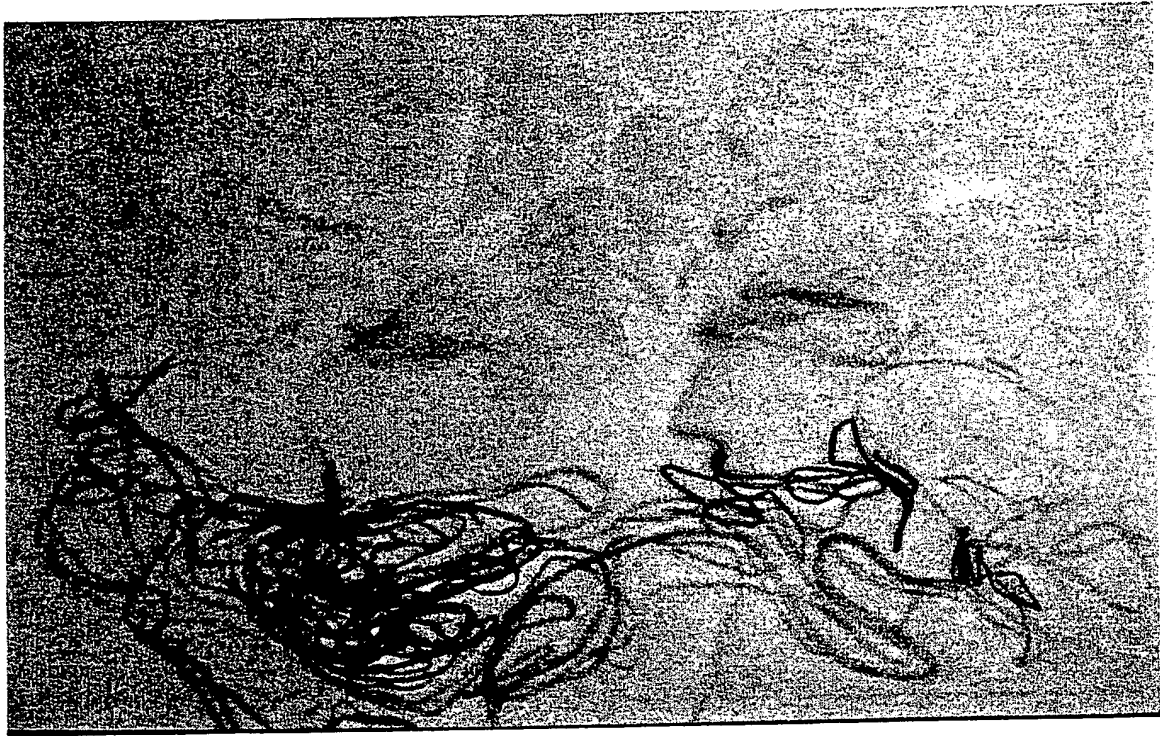
7/22

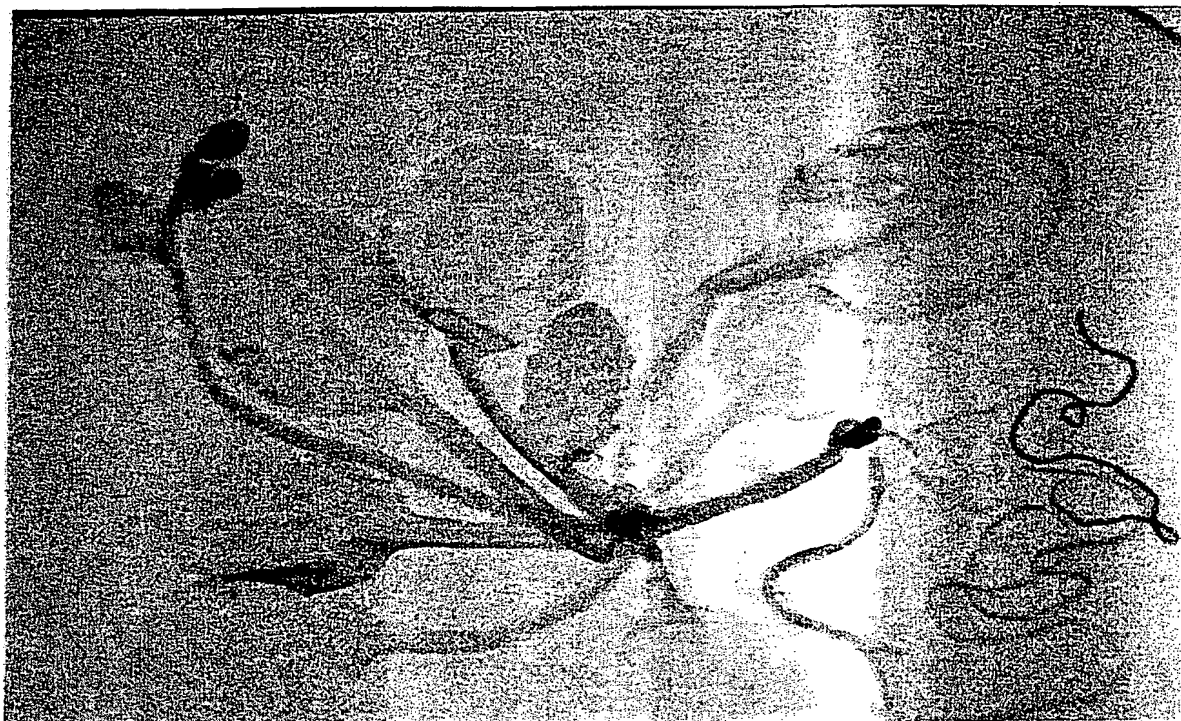
**PBin19-insert2**

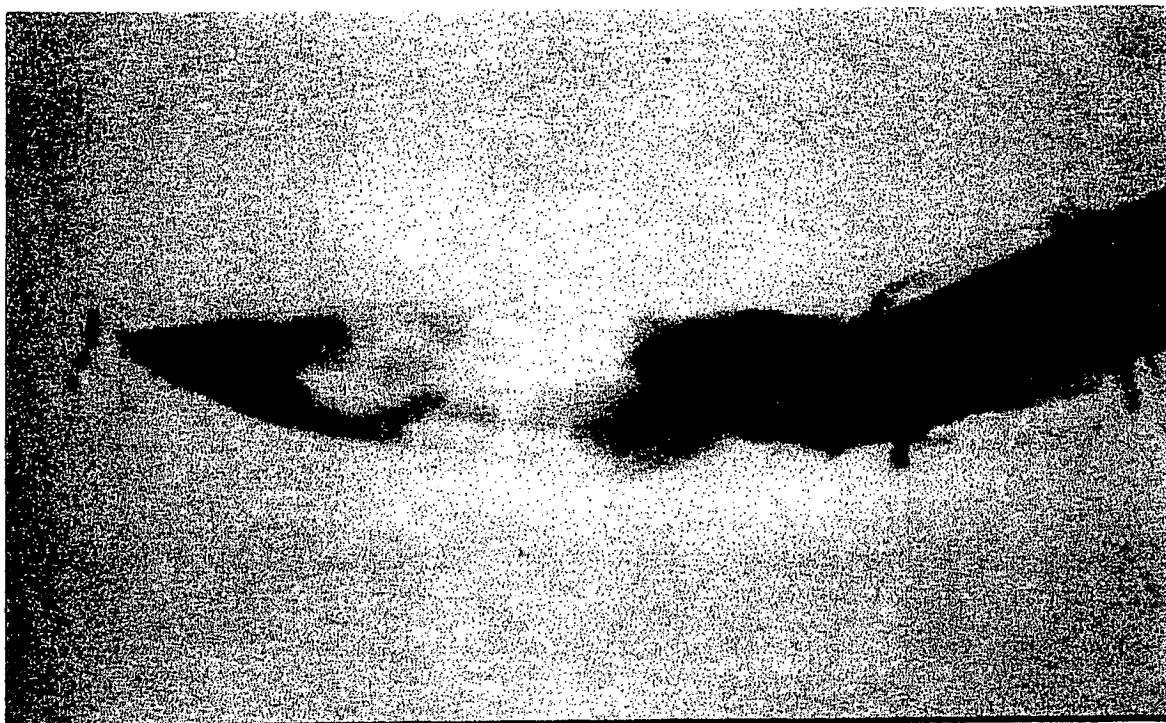
16.00 Kb

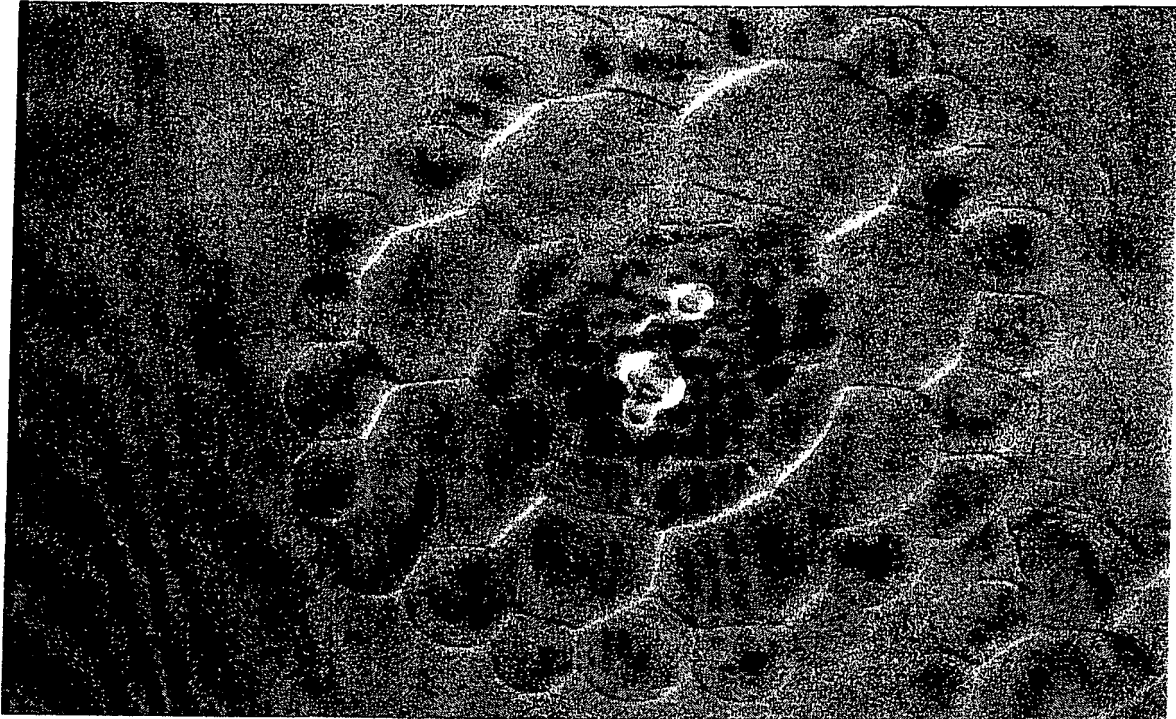
Figure 2 (b).











13/22

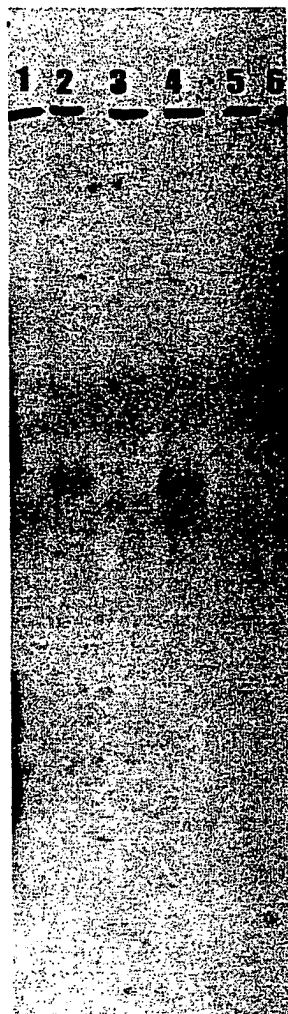


Figure 5



14/22

a

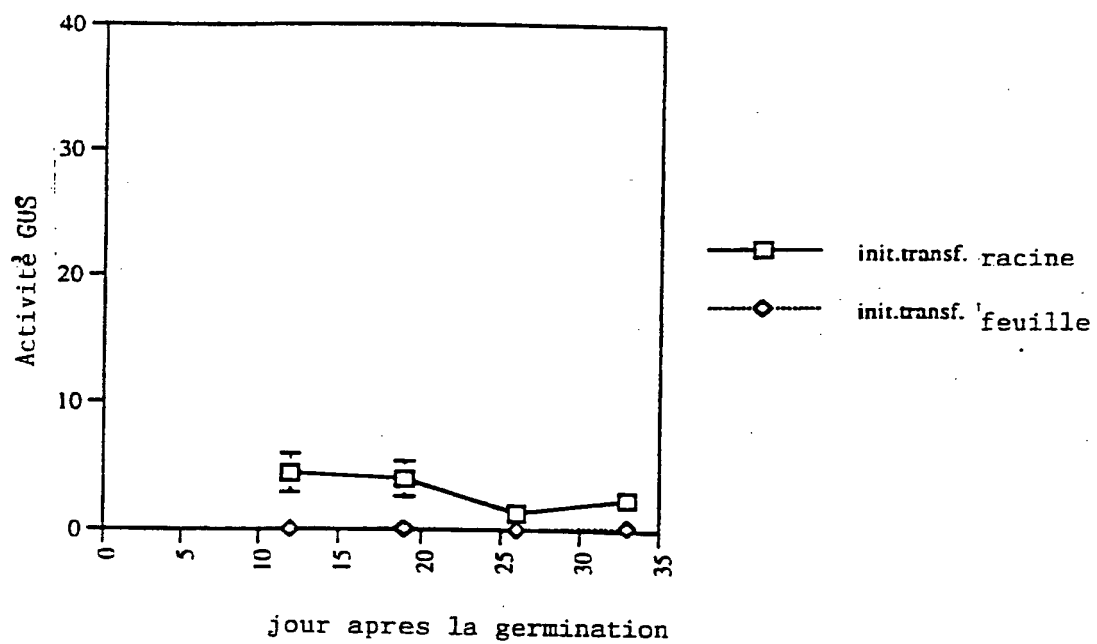


Figure 6(a)

15/22

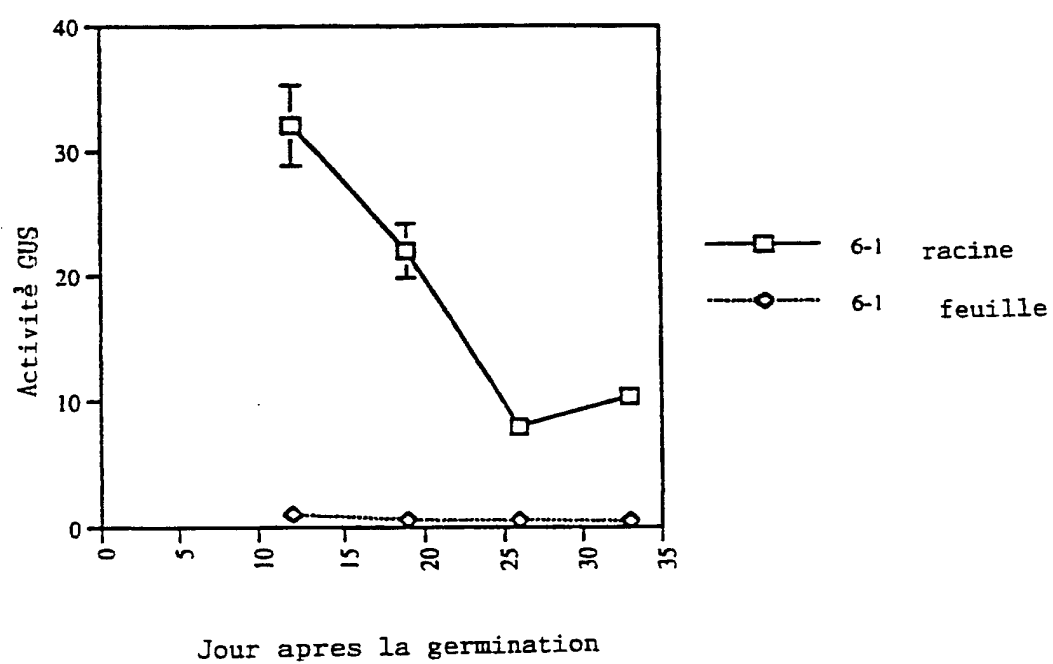
**b**

figure 6(b):

16/22

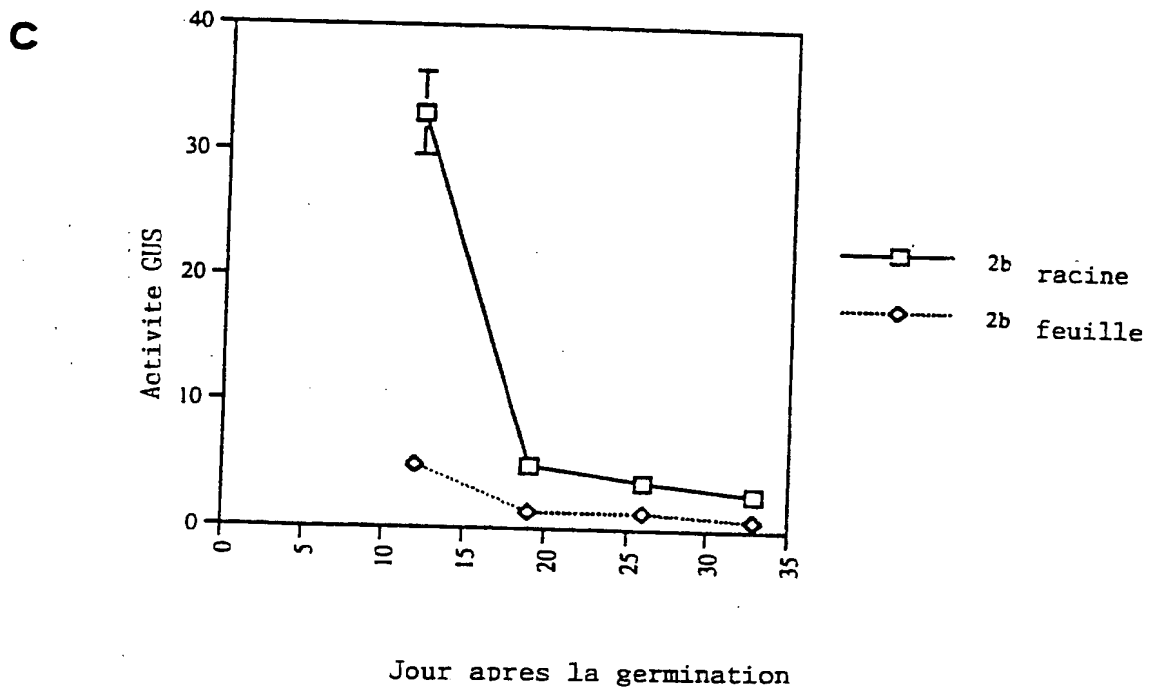


Figure 6(c)

17/22

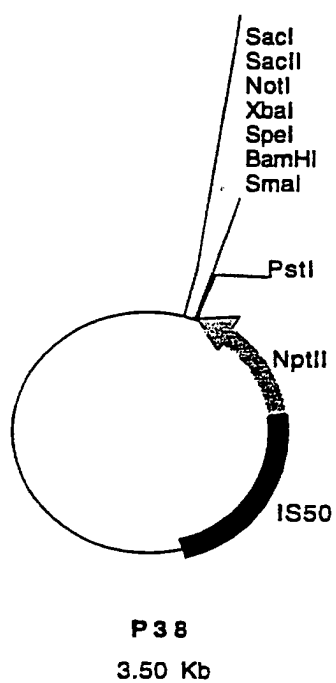
**a**

Figure 7(a)

18/22

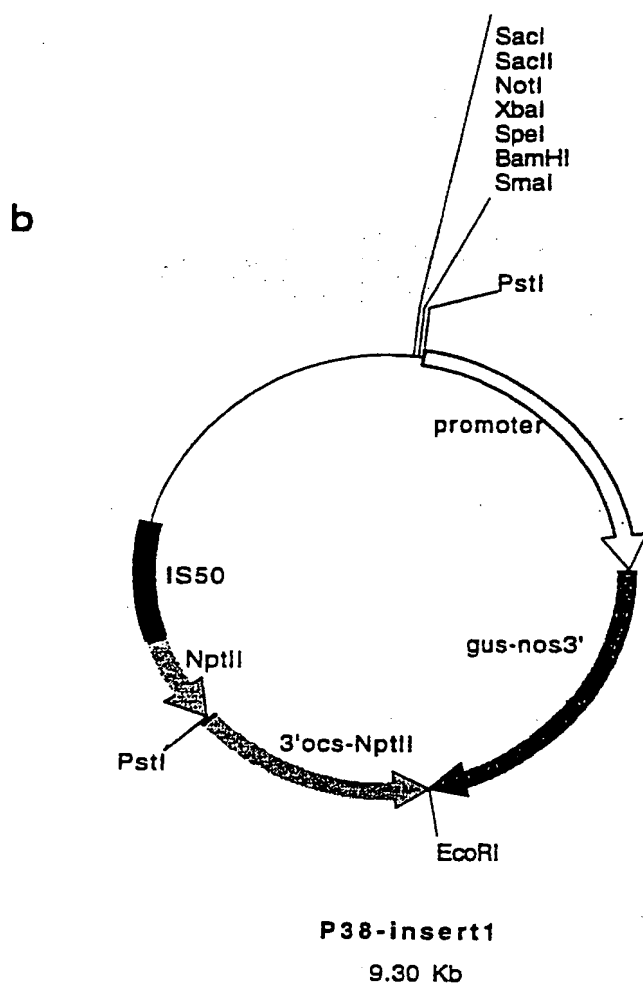


Figure 7(b)

1.9/22

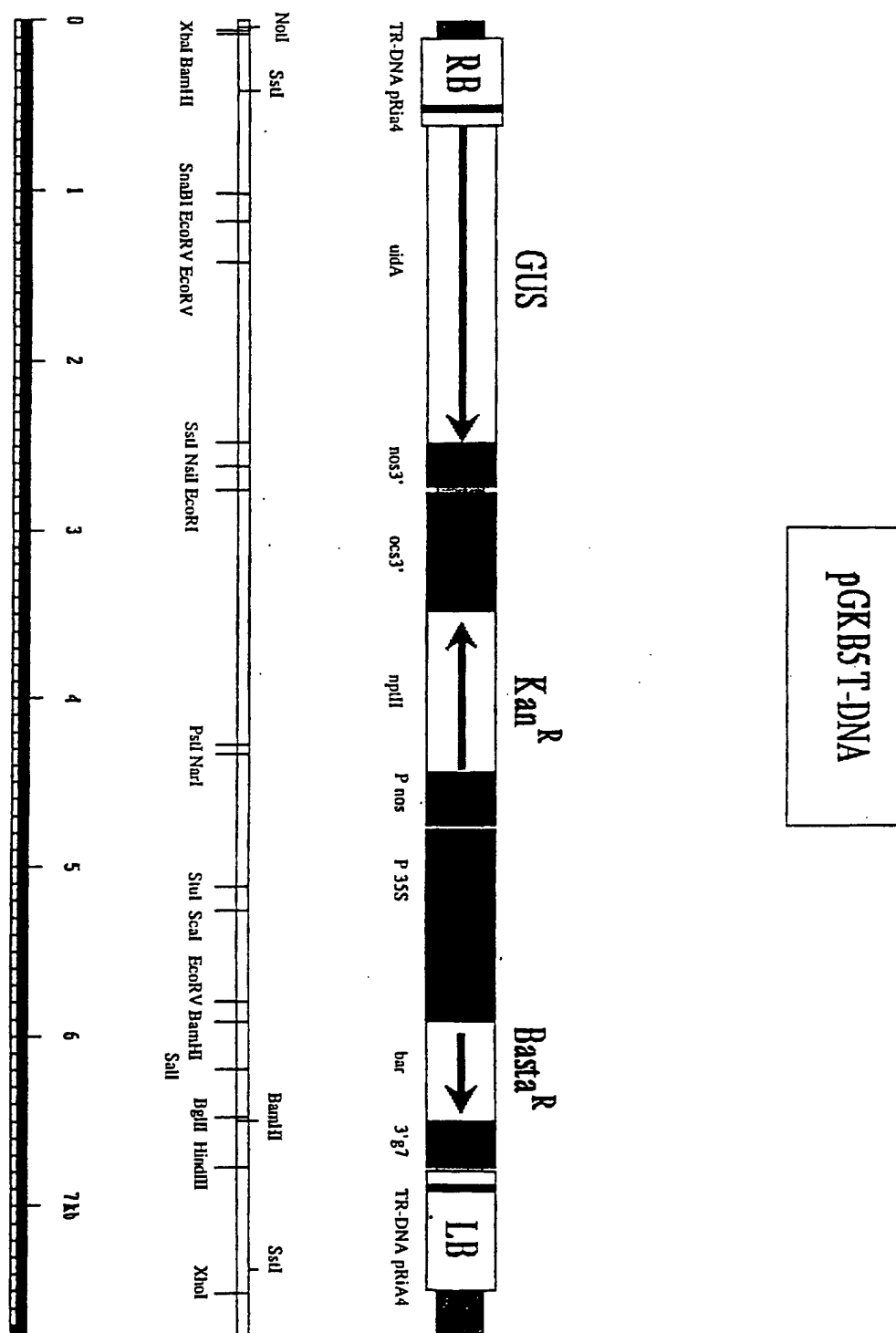


Figure 8

**FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)**

20/22

```

1  GGAAACAGCT ATGACCATGA TTACGCCAAG CTCGGAATTA ACCCTCACTA AAGGGAACAA
61 AAGCTGGAGC TCCACCGCGG TGGCGGCCCG TCTAGAGGAT CCCCCACAG ACAGCTCCGT
121 AGCCCTCGTT CTCCTTGGAG TTCTTCGGGA AATGGATCTT TCGATTCCCG ATGATGTCTC
181 TCTTATCTGC TTTGACGACG CCGACTGGAC ATCCGCTATA ACGCCGCCAT TGACCGTGAT
241 TTCGCAACCT GTCAGGGATC TCGCGACGGC TGCCACAGAA GACCTGATCG CCGCTTTAAA
301 GGGCGAGACT TCAGCCCCAC CCAAGGAAAC TCTTCTCCCG GCGGTTCTCA TAGAGCGCGG
361 TTCCGTAAAG GGTCTCTCGC AAGGTCGGGG TTGCATACCG AACTCGCGAA ACCTCGGCGA
421 CTGAGCTCCC GAGGCGCGTT GACAAGATGC CACGAAGGGA ATGGAAGACA GCCGATATTG
481 CAATTGTCTT CGTGGACTGC TTTCCGGGACG TAAGGCGCAA GCCATCATCA CCGCGTCTCT
541 AAACAAACAT ACCTCCACAC AAATTTATCT ACCTGACCAC AAGATATATC CTGTACACCG
601 ATTTATTAAA CGCTGCACTT GGGGTGGTCA G/TCCCTTATG TTACGTCTTG TAGAAACCCC
661 AACCCGTGAA ATCAAAAAAC TCACCGCCCT GTGGGCATTG AGTCTGGATC GCGAAAACTG
721 TGGAAATGAT CAGCGTTGGT GGGAAAGCGC GTTACAAGAA AGCCGGGCAA TTGCTGTGCC
781 AGGCAGTTTT AACGATCAGT TCGCCGATGC AGATATTTCG AATTATGCGG GCAACGTCTG
841 GTATCAGCGC GAAGTCTTTA TACCGAAAGG TTGGGCAGGC CAGCGTATCG TGCTGCGTTT
901 CGATGCGGTC ACTCATTACG GCAAAGTGTC GGTCAATAAT CAGGAAGTGA TGGAGCATCA
961 GGGCGGTAT ACGCCATTG AAGCCGATGT CACGCCGTAT GTTATTGCCG GGAAGAGTGT
1021 ACCTATCACC GTTTGTGTA ACAACGAACT GAAGTGGCAG ACTATCCCGC CGGGAATGGT
1081 GATTACCGAC GAAAACGGCA AGAAAAAGCA GTCTTACTTC CATGATTTCT TTAATATGTC
1141 CGGAATCCAT CGCAGCGTAA TGCTCTACAC CACGCCGAAC ACCTGGGTGG ACATATACAC
1201 CGTGGTGACG CATGTCGCGC AAGACTGTAA CCACGCGTCT GTTGACTGGC AGGTGGTGGC
1261 CAATGGTGAT GTCAGCGTTG AACTGCGTGA TGCGGATCAA CAGGTGGTTG CAATCGGACA
1321 AGGCACTAGC GGGACTTTGC AAGTGGTGAA TCCGCACCTC TGGCAACCGG GTGAAGGTTA
1381 TCTCTATGAA CTGTGCGTCA CAGCCAAAAG CCAGACAGAG TGTGATATCT ACCCGCTTCG
1441 CGTCGGCATC CGGTCACTGG CAGTGAAGGG CCAACAGTTC CTGATTAACC ACAAAACGTT
1501 CTCTTTACT GGCTTTGGTC GTCATGAAGA TGCGGACTTA CGTGGCAAAG GATTCGATAA
1561 CGTGTCTGAT GTGCACGACC ACGCATTAAT GGACTGGATT GGGGCCAACT CCTACCGTAC
1621 CTCGCATTAC CCTTACGCTG AAGAGATGCT CGACTGGGCA GATGAACATG GCATCGTGGT
1681 GATTGATGAA ACTGCTGCTG TCGGCTTTAA CCTCTCTTTA GGCATTGGTT TCGAAGCGGG
1741 CAACAAGCCG AAAGAAGTGT ACAGCGAAGA GGCAGTCAAC GGGGAAACTC AGCAAGCGCA
1801 CTTACAGGCG ATTTAAAGAG TGATAGCGCG TGACAAAAAC CACCAAGCGG TGGTGATGTG
1861 GAGTATTGCC AACGAACCGG ATACCCGTCC GCAAGTGCAC GGAATATTTT CGCCACTGGC
1921 GGAAGCAACG CGTAAACTCG ACCCGACGCG TCCGATCACC TCGTCAATG TAATGTTCTG
1981 CGACGTCAC ACCGATACCA TCAGCGACTC CTTTGATGTG CTGTGCCTGA ACCGTTATTA
2041 CGGATGGTAT GTCCAAAGCG GCGATTTGGA AACGGCAGAG AAGGTACTGG AAAAAGAACT
2101 TCTGGCCTGG CAGGAGAAAC TGCATCAGCC GATTATCATC ACCGAATACG GCGTGGATAC
2161 GTTAGCCGGG CTGCACTCAA TGTACACCGA CATGTGGAGT GAAGAGTATC AGTGTGCATG
2221 GCTCAGCGCG TATCACCOCG TCTTTGATCG CGTCAGCGCC GTCGTCGGTG AACAGGTATG
2281 GAATTTCCGC GATTTTGCGA CCTCGCAAGG CATATTGCGC GTTGGCGGTA ACAAGAAAGG
2341 GATCTTCACT CGCGACCGCA AACCAGAGTC GCGCGCTTTT CTGCTGCAAA AACGCTGGAC
2401 TGGCATGAAC TTCGGTGAAA AACCAGAGCA GGGAGGCAAA CAATGAATCA ACAACTCTCC
2461 TGGCGCACCA TCGTCGGCTA CAGCCTCGGT GGGGAATTGA GCTCGATCGT TCAAACATTT
2521 TGCAATAAAG TTTCTTAAGA TTGAATCCTG TTGCCGCTCT TGCGATGATT ATCATATAAT
2581 TTCTGTTGAA TTACGTTAAG CATGTAATAA TTAACATGTA ATGCATGACG TTATTTATGA
2641 GATGGGTTTT TATGATTAGA GTCCCGCAAT TATACATTTA ATACCGGATA GAAAACAAAA
2701 TATAGCGCGC AAAGTAGGAT AAATATCGC GCGCGGTGTC ATCTATGTTA CTAGATCGAA
2761 TT/CGATCGAG GGGATCGAGC CCTGCTGAG CCTCGACATG TTGTCGCAAA ATTTCGCCCTG
2821 GACCCGCCCA ACGATTTGTC GTCAGTGTCA AGGTTTGACC TGCATTTCAT TTGGGGCCCA
2881 CATAACCCAA AAAAATGCTG CATAATTCTC GGGGCAGCAA GTCGGTTACC CGGCCGCCGT
2941 GCTGGACCGG GTTGAATGGT GCCCGTAAC TCCGGTAGAG CGGACGGCCA ATACTCAACT
3001 TCAAGGAATC TCACCCATGC GCGCGCGCGG GGAACGGGAG TTCCCTTCAG TGAACGTTAT
3061 TAGTTCCGCC CTCGGTGTGT CGTAGATACT AGCCCCTGGG GCCTTTTGAA ATTTGAATAA
3121 GATTTATGTA ATCAGTCTTT TAGGTTTGAC CGGTTCTGCC GCTTTTPTTA AAATTGGATT
3181 TGTAATAATA AAACGCAATT GTTTGTTATT GTGGCGCTCT ATCATAGATG TCGCTATAAA
3241 CCTATTACG ACAATATATT GTTTTCATTT TAATATTGTA CATATAAGTA GTAGGTATCA
3301 ATCAGTAAAT TGAACGGAGA ATATTATTCA TAAAAATACG ATAGTAACGG GTGTGATATT
3361 CATTAGAATG AACCAGAAAC GCGGTAAGG ATCTGAGCTA CACATGCTCA GGTTTTTTAC
3421 AACGTGCACA ACAGAATTGA AAGCAAATAT CATGCGATCA TAGGCGTCTC GCATATCTCA
3481 TTAAGCAGG GGGTGGGCGA AGAACTCCAG CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA
3541 GCCGCGCTCC CGGAAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CCGGTGGAATC
3601 GAAATCTCGT GATGGCAGGT TGGCGTTCGC TTGGTCCGTC ATTTGCAACC CCAGAGTCCC

```

Figure 9(1)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

21/22

```

3661 GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC GCTGCGAATC GGGAGCGGCG
3721 ATACCGTAAA GCACGAGGAA GCGGTCAGCC CATTCGCCGC CAAGCTCTTC AGCAATATCA
3781 CCGGTAGCCA ACGCTATGTC CTGATAGCGG TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG
3841 AATCCAGAAA AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTTCGGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC
3901 ACGACGAGAT CCTCGCCGTC GGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG TTCGGCTGGC
3961 GCGAGCCCTT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA CAAGACCGGC TTCCATCCGA
4021 GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCGCT TGGTGGTCTGA ATGGGCAGGT AGCCGGATCA
4081 AGCGTATGCA GCCGCCGCAT TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG
4141 TGAGATGACA GGAGATCCTG CCCCGCCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CTTTCCCGCT
4201 TCAGTGACAA CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCG TCGTGGCCAG CCACGATAGC
4261 CGCGCTGCCT CGTCTGTCAG TTCATTTCAGG GCACCGGACA GGTGGTCTT GACAAAAAGA
4321 ACCGGGCGCC CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC ACGGCGGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT
4381 TGTGCCAGT CATAGCCGAA TAGCCTCTCC GCGATCTTTG ATTGAGAGTG AATATGAGAC
4441 CCATCTTGTT CAATCCACAT GATCATGGGC CGGATCTTTG AGCATTTTGT ACAAGAAATA
4501 TCTAATTGGA TACCGAGGGG AATTTATGGA ACGTCAGTGG AGCATTTTGT ACAAGAAATA
4561 TTTGCTAGCT GATAGTGACC TTAGGCGACT TTTGAACGCG CAATAATGGT TTCTGACGTA
4621 TGTGCTTAGC TCATTAAACT CCAGAAACCC GCGGCTGAGT GGCTCTCTCA ATCGTTGCGG
4681 TTCTGTCACT TCCAAACGTA AAACGGCTTG TCCCGCGTCA TCGGCGGGGG TCATAACGTG
4741 ACTCCCTTAA TTCTCCGCTC ATGATCCTGT TTCCTGTGTG AAATGTGTAT CCGCTCACAA
4801 TTCCACACAT TATACGAGCC GGAAGCATAA AGTGTAAGC CTGGGGTGCC TAATGAGTGA
4861 GCTAATCTAC ATTAATTGCG TTGCGCTCAC TGCCCGCTTT CCAGTCGGGA AACCTGTCTGT
4921 GCCAGCTGCA TTAATGAATC GGAATTGACG GATCTCTCTT GCCCGGAGA TCACCATGGA
4981 CGACTTTCTC TATCTCTACG ATCTAGGAAG AAAGTTCGAC GGAGAAGGTG ACGATACCAT
5041 GTTCAACCACC GATAATGAGA AGATTAGCCT CTTCAATTTC AGAAAGAAATG CTGACCCACA
5101 GATGGTTAGA GAGGCCTACG CGGCAGGTCT CATCAAGACG ATCTACCCGA GTAATAATCT
5161 CCAGGAGATC AAATACCTTC CCAAGAAGGT TAAAGATGCA GTCAAAAGAT TCAGGACTAA
5221 CTGCATCAAG AACACAGAGA AAGATATATT TCTCAAGATC AGAAGTACTA TTCCAGTATG
5281 GACGATTCAA GGCTTGCTTC ATAAACCAAG GCAAGTAATA GAGATTGGAG TCTCTAAGAA
5341 AGTAGTTCCT ACTGAATCAA AGGCCATGGA GTCAAAATTT CAGATCGAGG ATCTAACAGA
5401 ACTCGCCGTG AAGACTGGCG AACAGTTCAT TGGAGCAGCA CACTCTCGTC TACTCCAAGA
5461 GAAAATCTTC GTCAACATGG TGGAGCAGCA CACTCTCGTC TACTCCAAGA ATATCAAAGA
5521 TACAGTCTCA GAAGACCAAA GGGCTATTGA GACTTTTCAA CAAAGGGTAA TATCGGGAAA
5581 CCTCTCGGA TTCCATTGCC CAGCTATCTG TCACTTCATC AAAAGGACAG TAGAAAAGGA
5641 AGGTGGCACC TACAAATGCC ATCATTGCGA TAAAGGAAAG GCTATCGTTC AAGATGCCTC
5701 TGCCGACAGT GGTCCCAAAG ATGGACCCCC ACCCAGGAGG AGCATCGTGG AAAAAGAAGA
5761 CGTTCCAACC ACGTCTTCAA AGCAAGTGGA TTGATGTGAT ATCTCCACTG ACGTAAGGGA
5821 TGACGCACAA TCCCACTATC CTTGCGAAGA CCCTTCCTCT ATATAAGGAA GTTCAATTTCA
5881 TTTGGAGAGG ACACGCTGAA ATCACCAGTC TCTCTCTACA AATCGGATCC ATGAGCCAG
5941 AACGACGCCC GGCCGACATC CGCCGTGCCA CCGAGGCGGA CATGCCGGCG GTCTGCACCA
6001 TCGTCAACCA CTACATCGAG ACAAGCACGG TCAACTTCCG TACCGAGCCG CAGGAACCCG
6061 AGGAGTGGAC GGACGACCTC GTCCGTCTGC GGGAGCGCTA TCCTTGCTC GTCCCGAGG
6121 TGGACGGCGA GGTGCGCGGC ATGCGCTACG CCGGCCCTCG GAAGGCACCG AACGCCTACG
6181 ACTGGACGGC CGAGTGCACC GTGTACGCTT TGGAGGCACA GGGCTTCAAG AGCGTGGTGC
6241 CCACGCTCTA CACCCACCTG CTGAAGTCCC TGGAGGCACA GGGCTTCAAG AGCGTGGTGC
6301 CTGTCAATCG GCTGCCAAC GACCCGAGCG TGGCATGCA CGAGGCGCTC GGATATGCCC
6361 CCCGCGGCAT GCTGCCGGCG GCCGGCTTCA AGCACGGGAA CTGGCATGAC GTGGGTTTCT
6421 GGCAGCTGGA CTTACGCTG CCGGTACCGC CCGTCCGGT CCTGCCCGTC ACCGAGATCT
6481 GATCTCACGC GTCTAGGATC CGATGGATCC CCCGATGAGC TAAGCTAGCT ATATCATCAA
6541 TTTATGTATT ACACATAATA TCGCACTCAG TCTTTTCACT ACGGCAATGT ACCAGCTGAT
6601 ATAATCAGTT ATTGAAATAT TTCTGAATTT AAACCTGCAAT CAATAAATTT ATGTTTTTTC
6661 TTGGACTATA ATACCTGACT TGTTATTTTA TCAATAAATA TTTAACTAT ATTTCTTTCA
6721 AGATGGGAAT TAACATCTAC AAATTGCCTT TTCTTATCGA CCATGTACAT CAAGCTTATC
6781 GATACCGTCG GCTATTGGTA ATAGGACACT GGGATTCTGT TTGGACAAC TTCTTCTCA
6841 TCTAAGCGTA GACAACCTC AACTGGAAC GGGCCGGACT CCAGGGCGTG TCCAGGTGC
6901 CCACGGAATA GTTTTGGCCA GACCCTTGAA AATCCGATTC AGTACAATCG ATTGCCCTCA
6961 TTTTACGTT GGCATATATC CTGCCAAACA GCCAACAACG CGCGTCCGGT GAATAGGAAA
7021 GCGTTTGAAG TGCTTGCTCA TATCGTGACG GTTGACAGCA CAGGTTGACC GCTTGATGAT
7081 TCGTACGAGC CGCCAAACAT TGGCTGTCTG AATGATATAC CATGTCAGAA CAGCAATCCG
7141 ATGGGGCGGA AAGCATTATC TTAATGCACA CCGAAATGGC GCGTCCGGTG GTGGAATACA
7201 CCGGACATAGA GGCCGTAAGT TCTGCATGGT CATCGTCCGA AAGGTGGCAG CAGGCGCACG
7261 GCTGTGGCCT CTGCTCTTT CAGCGTGAAG TGGTGTGTA AAGAATAATC GAAGAGAGCG
7321 TCCGCTCGAC ACCTTCAATT ATGCCGATTT GATCGATGAA CTGATCGAGC TCTGAAATCG
7381 AAGGGGCTTC GATAATCGCA ATCAAATCAA AAGTGCCACT CACAGAATGA AGAGCGATAA
7441 CCGCGGTGAC CTTCCTCAAG GAGGCCGTCA CCGTGTGAAG CGCTTCGTA ATGGTGATCA
7501 GAATATGGGC TCGAACCAAG CTCGAGACCT CGAGGGGGGG CCGGTACCC AATTCCGCCCT
7561 ATAGTGAGTC GTATTACAAT TCACTGGCCG TCGTTTTAC

```

Figure 9(2)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLÉ 26)



22/22

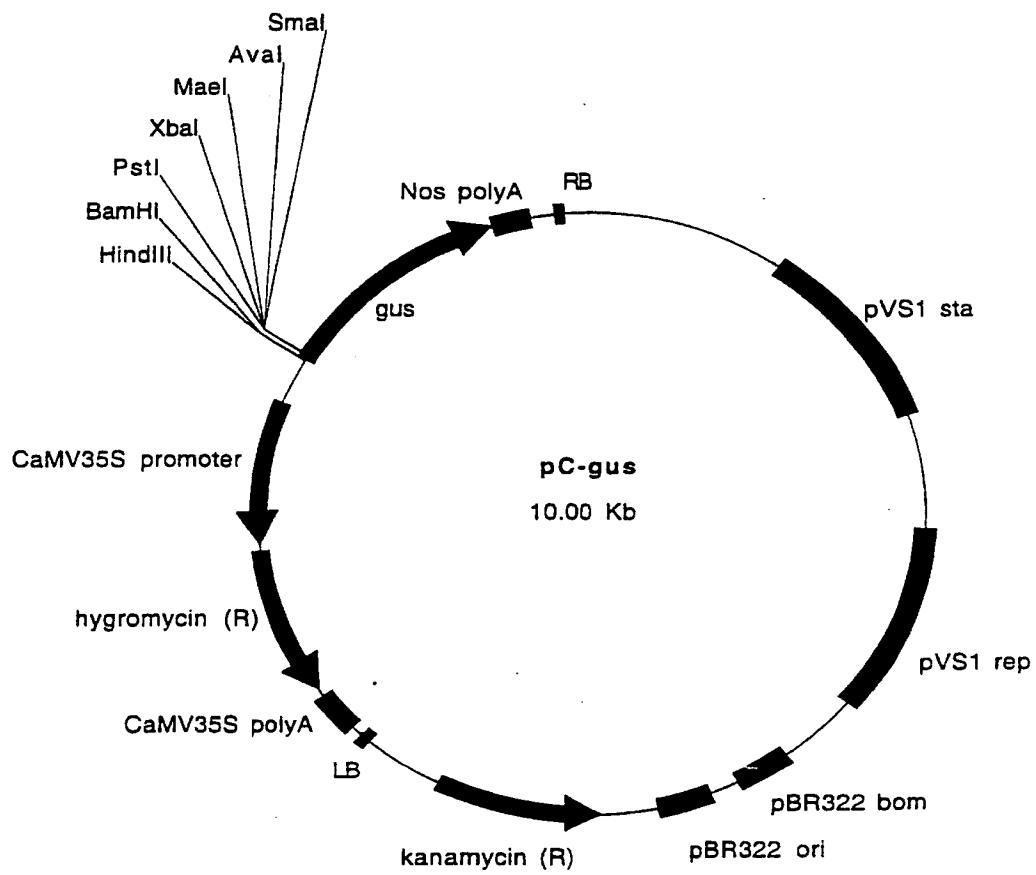


FIGURE 10

## LISTE DE SEQUENCES

<110> Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)

<120> Promoteur s'exprimant spécifiquement dans les cellules  
de racines de plantes, vecteurs et cellules hôtes  
recombinantes comprenant un tel promoteur et plantes  
transgéniques obtenues

<130> INRA Promoteur Végétal Racine

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2149

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

```
gtcgaattgt gatataattgt aagcaatctg aaaagaataa gtgggatata taaacaaccg 60
gcgaaagtac aagttctacc tttttttggc atggaaccat gtttttagga tttactttgt 120
aattcctgaa tctttcattt cttgaattga tatttacatt tttatcaaaa aaaaagtaca 180
agttctacca aagcacagga gttaaacaac ttgtgtgtca aatgctaatt taaagcctaa 240
tcttatgatt tcccttttct tcacgatata tactgatatt gatatgcacc catttgtttg 300
tcattaactt cccactctat acatcagtat ctcaaagtcg aataacaata tccataagaa 360
gtggtatatt gtgaaaaaaaa aaaaaaaaaag tgggtatactg gtatatacaa taccacggtc 420
tcgaattgcc tcaacaattt ctaggagaaa atggacgtgt ctctttgggt ttattttatt 480
cttaataaca tactctatat tttaaact tcgatgtctc gcttaaattt cgaatgtgcc 540
taaatttctc taatcataaa tcgtaaagaa aattcgtcga agccacaggg acatgcatag 600
ggcacgtagt taccttttaa accatcaaaa atatattaat agaaaaggaa acttcctaaa 660
```

2

```

agaacaattt aataaagtgg ataaaaaaag ataagaaggt aggcagaaga aaacgtatgg 720
ccgcgactcg taacaaggga cgtcccgcacc actgcggaga cggcgagacg ctgactgatt 780
ttttcttttt cttttcctaa agaacgttgt ttcgtgctta caaggggtcaa aaccatatcc 840
aattgttctg cctattatta tataactaaa gatccccctc tgtgctttgt ctttattcgt 900
gatatataat ctaacttaaa ttagttctaa aatatatatg tcctacctat gtttctactg 960
acctcagtcc ctagttagct atatggacat atgtgaaaat gacgccccaa atttgaagag 1020
ttcctcttcc tgcaactaac tcttatctta ctcatgagc tatgttaaatt attgaatgtt 1080
ggcactctcg tattaaatat gccagttgca cctagataaa aaaacatgat agacatttag 1140
tttaaaactt gaaatgttat ttgaactctt tggattacgt ggattgttgt atggattaaa 1200
ttttgaagat atttatatat tgaagatgtt tatatatatt agagtttata tagcagaaaa 1260
tattgatgta gatgttgctc ttttgtagtt actctttttt gttgcgtagt cctttctcct 1320
catcctccta tgaagaaaaa tccaaatagt ttaaggaaat ttttggtgtaa ttcatagtct 1380
ttttcgtaac cacagttcta tgtagctatc gtcacatata tcctctttgc aacaacaaaa 1440
aagatcgttt ttgtaaaatt tagtagggca ctaaagtcgt catttggtgt cctgtcgaaa 1500
tctagcgctc tgtcatccac aaataagttg ttgattoga gcttccaaga ttataatctt 1560
ttttagatgg gtcatagaaga tttctaactt cgtatacgag tgtatccata taattttctaa 1620
catatacgtc ttgtttttgg taggctctgc gtcttttgag accacccccct tgctaattgtt 1680
ttgttgcacc ttagacaatc cataatacgt tacgtgagtc gaagttgcac caaaatggtc 1740
caaataataat ttaaatttgg ccacaaaaca acattttaca aacaaattca acaaacatgc 1800
atcgtttcaa atttttattta ttcaatggcg ttatttgctt attgtaaata ttctgtttta 1860
ctcactgacg aatttttttaa tttttcaaag aagaacattt ttgatataaa taacatttta 1920
tggaaccacc ggttaagctc gatgattttg agtttttagt ttgtcgtttt gtgaaatcat 1980
taacgacctc catttgatcc ctcatctt taataattag gaatcaaaca tgatgattaa 2040
gttcaccaa gacgtctctt atggctatta agagtcagac gcaaggatga ccgggggtcat 2100
taagacgtct tatattcaac cattactcca ctaattgcta attaatacag 2149

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 4280

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence

artificielle:Construction promoteur + séquence

codante du gène gus

&lt;400&gt; 2

```
gtcgaattgt gatatattgt aagcaatctg aaaagaataa gtgggatata taaacaaccg 60
gcgaaagtac aagttctacc tttttttggc atggaaccat gtttttagga tttactttgt 120
aatcctgaa tctttcattt cttgaattga tatttacatt tttatcaaaa aaaaagtaca 180
agttctacca aagcacagga gttaaacaac ttgtgtgtca aatgctaatt taaagcctaa 240
tcttatgatt tcccttttct tcacgatata tactgatatt gatatgcacc catttgtttg 300
tcattaactt cccactctat acatcagtat ctcaaagtcg aataacaata tccataagaa 360
gtggtatatt gtgaaaaaaaa aaaaaaaaaag tgggtatactg gtatatacaa taccacggtc 420
tcgaattgcc tcaacaattt ctaggagaaa atggacgtgt ctctttgggt ttattttatt 480
cttaataaca tactctatat tttaaacact tcgatgtctc gcttaaattt cgaatgtgcc 540
taaattttct taatcataaa tcgtaaagaa aattcgtcga agccacaggg acatgcatag 600
ggcacgtagt taccttttaa accatcaaaa atatattaat agaaaaggaa acttcctaaa 660
agaacaattt aataaagtgg ataaaaaaag ataagaaggt aggcagaaga aaacgtatgg 720
ccgcgactcg taacaaggga cgtcccgacc actgcggaga cggcgagacg ctgactgatt 780
ttttcttttt cttttcctaa agaacgttgt ttctgtctta caaggggtcaa aaccatatcc 840
aattgttctg cctattatta tataactaaa gatccccctt tgtgctttgt ctttattcgt 900
gatataaat ctaacttaaa ttagttctaa aatatatatg tcctacctat gtttctactg 960
acctcagtc ctagttagct atatggacat atgtgaaaat gacgcccaa atttgaagag 1020
ttcctcttcc tgcaactaac tcttatctta ctcatgagc tatgttaaat attgaatgtt 1080
ggcactctcg tattaaatat gccagttgca cctagataaa aaaacatgat agacatttag 1140
tttaaaactt gaaatgttat ttgaactctt tggattacgt ggattgttgt atggattaaa 1200
ttttgaagat atttatatat tgaagatgtt tatatatatt agagtttata tagcagaaaa 1260
tattgatgta gatgttggtc ttttgtagtt actctttttt gttgcgtagt cctttctcct 1320
catcctccta tgaagaaaaa tccaaatagt ttaaggaaat ttttgtgtaa ttcatagtct 1380
ttttcgtaac cacagttcta tgtagctatc gtcatcatat tcctctttgc aacaacaaaa 1440
aagatcgttt ttgtaaaatt tagtagggca ctaaagtcgt catttgttgt cctgtcgaaa 1500
tctagcgttc tgtcatccac aaataagttg tttgattcga gcttccaaga ttataatctt 1560
tttttagatgg gtcatgaaga tttctaactt cgtatacgag tgtatccata taatttctaa 1620
catatacgtc ttgttttttg taggctctgc gtcttttgag accacccctt tgctaagtgt 1680
ttgttgcacc ttagacaatc cataatacgt tacgtgagtc gaagttgcac caaaatggtc 1740
caaatataat ttaaatttgg ccacaaaaca acattttaca aacaaattca acaaacatgc 1800
atcgtttcaa attttattta ttcaatggcg ttatttggtc attgtaaata ttctgtttaa 1860
ctcactgacg aattttttta tttttcaaag aagaacattt ttgatataaa taacatttta 1920
```

4

tggaaccacc ggttaagctc gatgattttg agtttttagtt ttgtcgtttt gtgaaatcat 1980  
 taacgaccta cttttgatcc ctctactact taataattag gaatcaaaca tgatgattaa 2040  
 gttcaccaaaa gacgtctctt atggctatta agagtcagac gcaaggatga ccgggggtcat 2100  
 taagacgtct tatattcaac cattactcca ctaattgcta attaatacagt cccttatgtt 2160  
 acgtcctgta gaaaccccaa cccgtgaaat caaaaaactc gacggcctgt gggcattcag 2220  
 tctggatcgc gaaaactgtg gaattgatca gcgttggtgg gaaagcgcgt tacaagaaag 2280  
 ccgggcaatt gctgtgccag gcagttttta cgatcagttc gccgatgcag atattcgtaa 2340  
 ttatgcgggc aacgtctggt atcagcgcga agtctttata ccgaaagggt gggcaggcca 2400  
 gcgtatcgtg ctgcgtttcg atgcggtcac tcattacggc aaagtgtggg tcaataatca 2460  
 ggaagtgatg gagcatcagg gcggctatac gccatttgaa gccgatgtca cgcggtatgt 2520  
 tattgccggg aaaagtgtac gtatcaccgt ttgtgtgaac aacgaactga actggcagac 2580  
 tatcccgccg ggaatggtga ttaccgacga aaacggcaag aaaaagcagt cttacttcca 2640  
 tgatttcttt aactatgccg gaatccatcg cagcgtaatg ctctacacca cgccgaacac 2700  
 ctgggtggac gatatcaccg tgggtgacga tytcgcgcaa gactgtaacc acgcgtctgt 2760  
 tgactggcag gtggtggcca atggtgatgt cagcgttgaa ctgcgtgatg cggatcaaca 2820  
 ggtggttgca actggacaag gcactagcgg gactttgcaa gtggtgaatc cgcacctctg 2880  
 gcaaccgggt gaaggttatc tctatgaact gtgcgtcaca gccaaaagcc agacagagtg 2940  
 tgatatctac ccgcttcgcg tcggcatccg gtcagtggca gtgaagggcc aacagttcct 3000  
 gattaaccac aaaccgttct actttactgg ctttggtcgt catgaagatg cggacttacg 3060  
 tggcaaagga ttcgataacg tgctgatggt gcacgaccac gcattaatgg actggattgg 3120  
 ggccaactcc taccgtacct cgcattacco ttacgctgaa gagatgctcg actgggcaga 3180  
 tgaacatggc atcgtggtga ttgatgaaac tgctgctgtc ggctttaacc tctctttagg 3240  
 cattggtttc gaagcgggca acaagccgaa agaactgtac agcgaagagg cagtcaacgg 3300  
 ggaaactcag caagcgcact tacaggcgat taaagagctg atagcgcgtg acaaaaacca 3360  
 cccaagcgtg gtgatgtgga gtattgccaa cgaaccggat acccgtccgc aagtgcacgg 3420  
 gaatatttcg ccactggcgg aagcaacgcg taaactcgac ccgacgcgtc cgatcacctg 3480  
 cgtcaatgta atgttctgcg acgctcacac cgataccatc agcgatctct ttgatgtgct 3540  
 gtgcctgaac cgttattacg gatggtatgt ccaaagcggc gatttggaac cggcagagaa 3600  
 ggtactggaa aaagaacttc tggcctggca ggagaaactg catcagccga ttatcatcac 3660  
 cgaatacggc gtggatacgt tagccgggct gcactcaatg tacaccgaca tgtggagtga 3720  
 agagtatcag tgtgcatggc tggatatgta tcaccgcgtc tttgatcgcg tcagcgccgt 3780  
 cgtcggtgaa caggatgga atttcgccga ttttgcgacc tcgcaaggca tattgcgcgt 3840  
 tggcggtaac aagaaagga tcttactcgc cgaccgcaaa ccgaagtcgg cggcttttct 3900  
 gctgcaaaaa cgctggactg gcatgaactt cggtgaaaaa ccgcagcagg gaggcaaaca 3960  
 atgaatcaac aactctcctg gcgcaccatc gtcggctaca gcctcgggtgg ggaattgagc 4020

5

tcgatacgttc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt gccggtcttg 4080  
 cgatgattat catataattt ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt aacatgtaat 4140  
 gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacattttaat 4200  
 acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcg cgggtgtcat 4260  
 ctatgttact agatcgaatt 4280

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 4413

&lt;212&gt; ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

&lt;400&gt; 3

aagatccaca gtgaataaat aataagaacg gattcgggtga tattgcaact atataatgaa 60  
 attgaataact ctgattcatc gctttgtatc aagatcgaat ctctaaaaac atataactcta 120  
 taataaatat ctgcagtcga attgtgatat attgtaagca atctgaaaag aataagtggg 180  
 atatataaac aaccggcgaa agtacaagtt ctaccttttt ttggcatgga accatgtttt 240  
 taggatttac tttgtaattc ctgaatcttt cttttcttga attgatattt acatttttat 300  
 caaaaaaaaa gtacaagttc taccaaagca caggagttaa acaacttgtg tgtcaaagtc 360  
 taatttaaag cctaacttta tgatttccct tttcttcacg atatatactg atattgatat 420  
 gcaccattt gtttgtcatt aacttccac tctatacatc agtatctcaa agtcgaataa 480  
 caatatccat aagaagtggg atattgtgaa aaaaaaaaaaaa aaaagtggta tactgggtata 540  
 tacaatacca cggctctgaa ttgcctcaac aatttctagg agaaaatgga cgtgtctctt 600  
 tgggttttatt ttattcttaa taacatactc tatattttta acacttcgat gtctcgctta 660  
 aatttcgaat gtgcctaaat ttctctaact ataaatcgta aagaaaattc gtcgaagcca 720  
 cagggacatg catagggcac gtagttacct ttaaaacct caaaaatata ttaatagaaa 780  
 aggaaacttc ctaaaagaac aatttaataa agtggataaa aaaagataag aaggtaggca 840  
 gaagaaaacg tatggccgag actcgtaaca agggacgtcc cgaccactgc ggagacggcg 900  
 agacgctgac tgattttttt tttttctttt cctaaagaac gttgtttcgt gcttacaagg 960  
 gtcaaaacca tatccaattg ttctgcctat tattatataa ctaaagatcc cctcttgtgc 1020  
 tttgtcttta ttctgtgatat ataactaac tttaaattagt tctaaaatat atatgtccta 1080  
 cctatgtttt tactgacctc agtccctagt tagctatatg gacatatgtg aaaatgacgc 1140  
 ccaaaatttg aagagttcct ctctctgcaa ctaactctta tcttactcat tgagctatgt 1200  
 taaatattga atgttggcac tctcgtatta aatatgccag ttgcacctag ataaaaaac 1260  
 atgatagaca tttagtttaa aacttgaaat gttatttgaa ctctttggat tacgtggatt 1320

gttgtatgga ttaaattttg aagatatatta tatattgaag atgtttatat atattagagt 1380  
 ttatatagca gaaaatattg atgtagatgt tgtccttttg tagttactct tttttgttgc 1440  
 gtagtccttt ctctcatcc tctatgaag aaaaatccaa atagttaaag gaaatttttg 1500  
 tgtaattcat agtctttttc gtaaccacag ttctatgtag ctatcgtcat catattcctc 1560  
 tttgcaacaa caaaaaagat cgttttttga aaatttagta gggcactaaa gtcgtcattt 1620  
 gttgtcctgt cgaaatctag cgttctgtca tccacaaata agttgtttga ttcgagcttc 1680  
 caagattata atctttttta gatgggtcat gaagatttct aacttcgtat acgagtgtat 1740  
 ccatataatt tctaacatat acgtcttgtt tttggtaggc tctgcgtctt ttgagaccac 1800  
 ccccttgcta atgttttgtt gcacctaga caatccataa tacgttacgt gaatcgaagt 1860  
 tgcacaaaaa tgggtccaaat ataatttaaa tttggccaca aaacaacatt ttacaaacaa 1920  
 attcaacaaa catgcatcgt ttcaaatttt atttattcaa tggcggttatt tgttcattgt 1980  
 aaatattctg tttaactcac tgacgaattt tttaattttt caaagaagaa catttttgat 2040  
 ataaataaca ttttatggaa ccaccgggta agctcgatga ttttgagttt tagttttgtc 2100  
 gttttgtgaa atcattaacg acctacattt gatccctcat tactttaata attaggaatc 2160  
 aaacatgatg attaagttca ccaaagacgt ctcttatggc tattaagagt cagacgcaag 2220  
 gatgaccggg gtcattaaga cgtcttatat tcaaccatta ctccactaat tgctaattaa 2280  
 tcagattaat ttgtttaata cgataatgta ttttgattaa gtagctctca gccaacaggc 2340  
 aaaggataaa ttttggatta ttcaaagatt tgtgggcttc caaaagcata gggaatggct 2400  
 ccaactacat tgggaaatat attatttaaa tctccattcc catttgccac agtcgttggg 2460  
 gtttattttt tttttccaag tggaagaatc aattataatt gtcggaattt ctaaattccta 2520  
 cttgttgga aacaaaccca agcaaaatta gtttagaaat gtacggaaat ctactataga 2580  
 attatactaa acatatcaat atagctttga ctttaaaatt aaaacaatta ttgtggggcaa 2640  
 ttagttagat attttaccag gggaaataag cagcactgtt catgcactct cttcttaatt 2700  
 actatacttt gaaagaactt atatgtcact gtattgccag ttgccactaa tatataaaca 2760  
 acatttcact tgttgacatc gctgtaaag aagtttgga cgaccctctt aacaactaat 2820  
 agggttaatt aaccactaaa tttttccaag ttgtcatttt gtcttaattg gagacgtaat 2880  
 atctaatacg tcggtctaac ctaagagttg gtccgatca caaatttttg agaagtacct 2940  
 ttcaataaaa aatttgttgt tataatttca ccgtgttaag taaaaactta attaggagct 3000  
 attttctatt tgatgtgaat ttgaaaatgt cttcataaaa atagtatgga aaagggaatg 3060  
 taattaatat agaccacaga taaaaaaga tgtcccggtc ttaacacgtc tgagtcattg 3120  
 tcgtaccctt ttgccaaact tttcaagttt ctttcgtgaa aatgactaca ctttttaaaa 3180  
 taaattgaca gatgattgtt gcatgcatat aatattcgca aaatgccaaa ttctaccctt 3240  
 aaccaaataa tgggtaatgg atataaaata gttaacataa acaaaaattt ggaaattttg 3300  
 aaaaatagag agtaaatgga ttttttttaa aaagtttgaa ttgaagtga aaaaatatata 3360  
 ataaaaataa taaacctgta gtttgatata tatagttaga tagctcaagt ttgagtaact 3420

7

```

tgaagtcttg aattacttta tatgtttttc tcacagatta tattattttc gttctatccc 3480
aagaattggg ataatatctt ctatatcgga ggctctcttc ttaagaagtc ggtgtataat 3540
cttaagccct tacttgacac aaggcctcta ttaaaaagcc caataataat ttttcttttc 3600
aaagcccaac acgtcaagag gagaaagaag tgcgtttgcg tttggattga aaacgtggcg 3660
ggcggttggg aactgaatct taaacccttc actcacattc atcttcaccg tcaaattctct 3720
gaaactgagc ttcgacgatg ttgggtttac gaagatctgc gacgaccttg ttcgacatca 3780
gccagtctct gcttcgtaat gttacgggta gtatctgtct aacacttcag cgccacattt 3840
gggtttttacg attaggggtt caatagatcg aatcgattca tctctcttgg tattagattt 3900
catcaaattc aaatctatcg tcacctaaaa atctctcttt cggtatgtag tatttccggg 3960
gttgtttcaa agtcgtctta ttgctctgtg attttggctt cttaccatt ttcaacagtg 4020
ctatgtagaa gaaagaacaa atctttgaaa tcgaaaggtc taatgtatag ttcaatgtct 4080
acattatgag attgccatga tattatagtc aaacgattct cctaaagcgt ttacttttgt 4140
ggagcattct ttgttagttc tatgcaaata aagttctagg aatgataatt cttaaggaag 4200
catctcaaat gttggctagt tcttgtctca ggttaaaaca atgttttgca atttgctttt 4260
agttagaatt gttgacttgc ttagcttttt gactaactct gtctctgtga agcaaagtgt 4320
gatcaaacc attaccttat ttgatttctc tcttttagatt atacatcaat ttatgtattt 4380
tctttgtcta cagtttcatg ggttacgagt cca 4413

```

<210> 4

<211> 4309

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Insert du vecteur pBin19

<400> 4

```

tctagaacta gtggatcccc cgggctgcag tcgaattgtg atatattgta agcaatctga 60
aaagaataag tgggatatat aaacaaccgg cgaaagtaca agttctacct ttttttggca 120
tggaaccatg ttttttaggat ttacttttga attcctgaat ctttcatttc ttgaattgat 180
atttacattt ttatcaaaaa aaaagtacaa gttctaccaa agcacaggag ttaaacaact 240
tgtgtgtcaa atgctaattt aaagcctaatt cttatgattt cccttttctt cacgatatat 300
actgatattg atatgcaccc atttgtttgt cattaaactc ccactctata catcagtatc 360

```



tcaaagtcga ataacaatat ccataagaag tgggtatattg tgaaaaaaaa aaaaaaaagt 420  
 ggtatactgg tatatacaat accacgggtct cgaattgcct caacaatttc taggagaaaa 480  
 tggacgtgtc tctttgggtt tatttttattc ttaataacat actctatatt ttaaactctt 540  
 cgatgtctcg cttaaatttc gaatgtgcct aaatttctct aatcataaat cgtaaagaaa 600  
 attcgtcgaa gccacaggga catgcatagg gcacgtagtt acctttaaaa ccatcaaaaa 660  
 tatattaata gaaaaggaaa cttcctaata gaacaattta ataaagtggg taaaaaaaga 720  
 taagaaggta ggcagaagaa aacgtatggc cgcgactcgt aacaaggggac gtcccgacca 780  
 ctgcgagagc ggcgagacgc tgaactgattt tttctttttc ttttcctaaa gaacgttggt 840  
 tcgtgcttac aaggggtcaa accatatcca attgttctgc ctattattat ataactaaag 900  
 atccccctct gtgctttgtc tttattcgtg atatataatc taacttaaat tagttctaaa 960  
 atatatatgt cctacctatg tttctactga cctcagtcct tagttagcta tatggacata 1020  
 tgtgaaaatg acgccccaaa tttgaagagt tctctctcct gcaactaact cttatcttac 1080  
 tcattgagct atgttaaata ttgaatgttg gcactctcgt attaaatatg ccagttgcac 1140  
 ctagataaaa aaacatgata gacatttagt ttaaaacttg aaatgttatt tgaactcttt 1200  
 ggattacgtg gattgttgta tggattaaat tttgaagata tttatatatt gaagatgttt 1260  
 atatatatta gagtttatat agcagaaaaat attgatgtag atgttgtcct tttgtagtta 1320  
 ctcttttttg ttgcgtagtc ctttctctc atcctcctat gaagaaaaat ccaaatagtt 1380  
 taaggaaatt tttgtgtaat tcatagtctt tttcgtaacc acagttctat gtagctatcg 1440  
 tcatcatatt cctctttgca acaacaaaaa agatcgtttt tgtaaaattt agtagggcac 1500  
 taaagtcgtc atttgttgtc ctgtcgaaat ctagcgttct gtcacccaca aataagttgt 1560  
 ttgattcgag cttccaagat tataatcttt tttagatggg tcatgaagat ttctaacttc 1620  
 gtatacgagt gtatccatat aattttctaac atatacgtct tgtttttggg aggctctgcg 1680  
 tcttttgaga ccacccccct gctaattgtt tgttgcacct tagacaatcc ataatacgtt 1740  
 acgtgagtcg aagttgcacc aaaatgggtc aaatataatt taaatttggc cacaaaacaa 1800  
 cattttacaa acaaatcaaa caaacatgca tcgtttcaaa ttttatattat tcaatggcgt 1860  
 tatttgttca ttgtaaatat tctgtttaac tcaactgacg attttttaac ttttcaaaga 1920  
 agaacatttt tgatataaat aacattttat ggaaccaccg gttaagctcg atgattttga 1980  
 gtttttagttt tgtcgttttg tgaaatcatt aacgacctac atttgatccc tcattacttt 2040  
 aataattagg aatcaaacat gatgattaag ttcaccaaag acgtctctta tggctattaa 2100  
 gagtcagacg caaggatgac cgggggtcatt aagacgtctt atattcaacc attactccac 2160  
 taattgctaa ttaatcagtc ccttatgtta cgtcctgtag aaaccccaac ccgtgaaatc 2220  
 aaaaaactcg acggcctgtg ggcattcagt ctggatcgcg aaaactgtgg aattgatcag 2280  
 cgttggtggg aaagcgcgtt acaagaaagc cgggcaattg ctgtgccagg cagttttaac 2340  
 gatcagttcg ccgatgcaga tattcgtaac tatgcgggca acgtctggta tcagcgcgaa 2400  
 gtctttatag cgaaagggtg ggcaggccag cgtatcgtgc tgcgtttcga tgcggtcact 2460

cattacggca aagtgtgggt caataatcag gaagtgatgg agcatcaggg cggctatacg 2520  
ccatttgaag ccgatgtcac gccgtatgtt attgccggga aaagtgtacg tatcaccgtt 2580  
tgtgtgaaca acgaactgaa ctggcagact atcccgcggg gaatgggtgat taccgacgaa 2640  
aacggcaaga aaaagcagtc ttacttccat gattttcttta actatgccgg aatccatcgc 2700  
agcgtaatgc tctacaccac gccgaacacc tgggtggacg atatcaccgt ggtgacgcat 2760  
gtcgcgcaag actgtaacca cgcgtctgtt gactggcagg tgggtggccaa tggatgatgtc 2820  
agcgttgaac tgcgtgatgc ggatcaacag gtggttgcaa ctggacaagg cactagcggg 2880  
actttgcaag tggatgaatcc gcacctctgg caaccgggtg aaggttatct ctatgaactg 2940  
tgcgtcacag ccaaaagcca gacagagtgt gatatctacc cgcttcgogt cggcatccgg 3000  
tcagtggcag tgaaggggcca acagttcctg attaaccaca aaccgttcta ctttactggc 3060  
tttggctcgtc atgaagatgc ggacttacgt ggcaaaggat tgcataacgt gctgatgggtg 3120  
cacgaccacg cattaatgga ctggattggg gccaaactct accgtacctc gcattacctt 3180  
tacgctgaag agatgctcga ctgggcagat gaacatggca tgcgtgggtgat tgatgaaact 3240  
gctgctgtcg gctttaacct ctcttttaggc attggtttcg aagcgggcaa caagccgaaa 3300  
gaactgtaca gcgaagaggc agtcaacggg gaaactcagc aagcgcactt acaggcgatt 3360  
aaagagctga tagcgcgtga caaaaaccac ccaagcgtgg tgatgtggag tattgccaac 3420  
gaaccggata ccggtccgca agtgcacggg aatatttcgc cactggcgga agcaacgcgt 3480  
aaactcgacc cgacgcgtcc gatcacctgc gtcaatgtaa tgttctgcga cgctcacacc 3540  
gataccatca gcgatctctt tgatgtgctg tgctgaacc gttattacgg atggtatgtc 3600  
caaagcggcg atttggaaac ggagagaag gtactggaaa aagaacttct ggcctggcag 3660  
gagaaactgc atcagccgat tatcatcacc gaatacggcg tggatacgtt agccgggctg 3720  
cactcaatgt acaccgacat gtggagtgaag gagtatcagt gtgcatggct ggatatgtat 3780  
caccgcgtct ttgatcgcgt cagcgcgctc gtcggtgaac aggtatggaa ttctgccgat 3840  
tttgcgacct cgcaaggcat attgcgcgtt ggcggttaaca agaaagggat cttcactcgc 3900  
gaccgcaaac cgaagtcggc ggcttttctg ctgcaaaaac gctggactgg catgaacttc 3960  
ggtgaaaaac cgcagcaggg aggcaaacaa tgaatcaaca actctcctgg cgcaccatcg 4020  
tcggctacag cctcgggtggg gaattgagct cgatcgttca aacatttggc aataaagttt 4080  
cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc tgttgaatta 4140  
cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat gggtttttat 4200  
gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa 4260  
ctaggataaa ttatcgcgcg cggtgtcacc tatgttacta gatcgaatt 4309

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 7599

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: ADN-T de  
PGKB5

&lt;400&gt; 5

```
ggaaacagct atgaccatga ttacgccaag ctcggaatta accctcacta aagggaacaa 60
aagctggagc tccaccgcgg tggcggcgcc tctagaggat ccccccacag acagctccgt 120
agccctcggt ctccctggag ttcttcggga aatggatctt tcgattcccg atgatgtctc 180
tcttatctgc tttgacgacg ccgactggac atccgctata acgccgccat tgaccgtgat 240
ttcgcaacct gtcagggatc tcgcgacggc tgccacagaa gacctgatcg cccgcttaaa 300
gggcgagact tcagccccac ccaaggaaac tcttctcccg gcggttctca tagagcgcg 360
ttccgtaagc ggttcttcgc aaggtcgggg ttgcataccg aactcgcgaa acgtcggcga 420
ctgagctccc gaggcgcgtt gacaagatgc cacgaaggga atggaagaca gccgatattg 480
caattgtctt cgtggactgc tttcgggacg taaggcgcaa gccatcatca ccgccgtcct 540
aaacaaacat acctccacac aaatttatct acctgaccac aagatatatc ctgtcacacg 600
atttattaaa cgctgcactt ggggtggtca gtcccttatg ttacgtcctg tagaaacccc 660
aaccctgaa atcaaaaaac tcgacggcct gtgggcattc agtctggatc gcgaaaactg 720
tggaattgat cagcgttggt gggaaagcgc gttacaagaa agccgggcaa ttgctgtgcc 780
aggcagtttt aacgatcagt tcgccgatgc agatattcgt aattatgcgg gcaacgtctg 840
gtatcagcgc gaagtcttta taccgaaagg ttgggcaggc cagcgtatcg tgctgcgttt 900
cgatgcggtc actcattacg gcaaagtgtg ggtcaataat caggaagtga tggagcatca 960
gggcggctat acgccatttg aagccgatgt cacgccgat gttattgccg ggaaaagtgt 1020
acgtatcacc gtttgtgtga acaacgaact gaactggcag actatccgc cgggaatggt 1080
gattaccgac gaaaacggca agaaaaagca gtcttacttc catgatttct ttaactatgc 1140
cggaatccat cgcagcgtaa tgctctacac cacgccgaac acctgggtgg acgatatcac 1200
cgtggtgacg catgtcgcgc aagactgtaa ccacgcgtct gttgactggc aggtggtggc 1260
caatggtgat gtcagcgttg aactgcgtga tgcggatcaa caggtggttg caactggaca 1320
aggcactagc gggacttttg aagtggtgaa tccgcacctc tggcaaccgg gtgaagggtta 1380
tctctatgaa ctgtgcgtca cagccaaaag ccagacagag tgtgatattc acccgcttcg 1440
cgtcggcatc cggtcagtgg cagtgaaggg ccaacagttc ctgattaacc acaaaccgtt 1500
ctactttact ggctttggtc gtcatgaaga tgcggactta cgtggcaaag gattcgataa 1560
cgtgctgatg gtgcacgacc acgcattaat ggactggatt ggggccaaact cctaccgtac 1620
```

ctctgcattac ccttacgctg aagagatgct cgactgggca gatgaacatg gcatcgtggg 1680  
 gattgatgaa actgctgctg tcggctttta cctctcttta ggcatctgggt tcgaagcggg 1740  
 caacaagccg aaagaactgt acagcgaaga ggcagtcaac ggggaaactc agcaagcgca 1800  
 ctacagggcg attaaagagc tgatagcgcg tgacaaaaac caccgaagcg tggatgatgtg 1860  
 gagtattgcc aacgaaccgg ataccgctcc gcaagtgcac gggaatatatt cgccactggc 1920  
 ggaagcaacg cgtaaaactcg acccgacggc tccgatcacc tgcgtcaatg taatgttctg 1980  
 cgacgctcac accgatacca tcagcgatct ctttgatgtg ctgtgcctga accgttatta 2040  
 cggatgggtat gtccaaagcg gcgatttgga aacggcagag aaggtactgg aaaaagaact 2100  
 tctggcctgg caggagaaac tgcacagcc gattatcacc accgaatacg gcgtgggatac 2160  
 gttagccggg ctgcactcaa tgtacaccga catgtggagt gaagagtatc agtgtgcatg 2220  
 gctggatatg tatcaccggc tctttgatcg cgtcagcgcc gtcgtcgggtg aacaggtatg 2280  
 gaatttcgcc gattttgcga cctcgcaagg catattgcgc gttggcggtg acaagaaagg 2340  
 gatcttcact cgcgaccgca aaccgaagtc ggcggctttt ctgctgcaaa aacgctggac 2400  
 tggcatgaac ttcggtgaaa aaccgcagca gggaggcaaa caatgaatca acaactctcc 2460  
 tggcgcacca tcgtcggcta cagcctcggg ggggaattga gctcgatcgt tcaaacattt 2520  
 ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg ttgccggtct tgcgatgatt atcatataat 2580  
 ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg ttatttatga 2640  
 gatgggtttt tatgattaga gtcccgaat tatacattta atacgcgata gaaaacaaaa 2700  
 tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gcgcggtgtc atctatgtta ctagatcgaa 2760  
 ttcgatcgag gggatcgagc ccctgctgag cctcgacatg ttgtcgcaaa attcgccctg 2820  
 gaccgcccc aagatttgtc gtcactgtca aggtttgacc tgcacttcat ttggggcccc 2880  
 catacaccaa aaaaatgctg cataattctc ggggcagcaa gtcggttacc cggccgccgt 2940  
 gctggaccgg gttgaatggg gcccgtaact ttcggtagag cggacggcca atactcaact 3000  
 tcaaggaatc tcacccatgc gcgcggcgcg ggaaccggag ttcccttcag tgaacgttat 3060  
 tagttcgccg ctcggtgtgt cgtagatact agccctggg gccttttgaa atttgataaa 3120  
 gatttatgta atcagtcctt taggtttgac cggttctgcc gcttttttta aaattggatt 3180  
 tgaataata aaacgcaatt gtttgattat gtggcgctct atcatagatg tcgctataaa 3240  
 cctattcagc acaatatatt gttttcattt taatattgta catataagta gtagggatca 3300  
 atcagtaaat tgaacggaga atattattca taaaaatag atagtaacgg gtgatataat 3360  
 cattagaatg aaccgaaacc ggcggtaagg atctgagcta cacatgctca ggttttttac 3420  
 aacgtgcaca acagaattga aagcaaatat catgcgatca taggcgtctc gcatatctca 3480  
 ttaaagcagg ggggtggcgga agaactccag catgagatcc ccgcgctgga ggatcatcca 3540  
 gccggcgctc cggaaaacga ttccgaagcc caacctttca tagaaggcgg cgggtggaatc 3600  
 gaaatctcgt gatggcaggt tgggcgtcgc ttggtcggtc atttcgaacc ccagagtcctc 3660  
 gctcagaaga actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg 3720

ataccgtaaa gcacgaggaa gcggtcagcc cattcgccgc caagctcttc agcaatatca 3780  
 cgggtagcca acgctatgtc ctgatagcgg tccgccacac ccagccggcc acagtcgatg 3840  
 aatccagaaa agcggccatt ttccaccatg atattcggca agcaggcatc gccatgggtc 3900  
 acgacgagat cctcgccgtc gggcatgcgc gccttgagcc tggcgaacag ttcggctggc 3960  
 gcgagccctt gatgctcttc gtccagatca tcttgatcga caagaccggc ttccatccga 4020  
 gtacgtgctc gctcgatgcg atgtttcgtc tgggtggcga atgggcaggt agccggatca 4080  
 agcgtatgca gccgccgcat tgcatacagc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg 4140  
 tgagatgaca ggagatcctg ccccgccact tcgcccaata gcagccagtc ccttcccgtc 4200  
 tcagtgacaa cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc 4260  
 cgcgctgcct cgtcctgcag ttcattcagg gcaccggaca ggtcggctctt gacaaaaaga 4320  
 accgggcgcc cctgcgctga cagccggaac acggcggcat cagagcagcc gattgtctgt 4380  
 tgtgcccagt catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat 4440  
 ccatcttggt caatccacat gatcatgggc cggatctttg attgagagtg aatatgagac 4500  
 tctaattgga taccgagggg aatttatgga acgtcagtgg agcatttttg acaagaaata 4560  
 tttgctagct gatagtgacc ttaggcgact tttgaacgcg caataatggt ttctgacgta 4620  
 tgtgcttagc tcattaaact ccagaaaccc gcggctgagt ggctccttca atcgttgcgg 4680  
 ttctgtcagt tccaaacgta aaacggcttg tcccgcgtca tcggcggggg tcataacgtg 4740  
 actcccttaa ttctccgctc atgatcctgt ttctgtgtg aaattgttat ccgctcacia 4800  
 ttccacacat tatacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctgggggtgcc taatgagtga 4860  
 gctaactcac attaatgagc ttgcgctcac tgcccgtttt ccagtcggga aacctgtcgt 4920  
 gccagctgca ttaatgaatc ggaattgacg gatctccttt gcccgggaga tcaccatgga 4980  
 cgactttctc tatctctacg atctaggaag aaagtctgac ggagaagggt acgataccat 5040  
 gttcaccacc gataatgaga agattagcct cttcaatttc agaaagaatg ctgaccacca 5100  
 gatggttaga gaggcctacg cggcaggtct catcaagacg atctaccga gtaataatct 5160  
 ccaggagatc aaataccttc ccaagaagg taaagatgca gtcaaaagat tcaggactaa 5220  
 ctgcatcaag aacacagaga aagatatatt tctcaagatc agaagtacta ttccagtatg 5280  
 gacgattcaa ggcttgcttc ataaaccaag gcaagtaata gagattggag tctctaagaa 5340  
 agtagttcct actgaatcaa aggccatgga gtcaaaaatt cagatcgagg atctaacaga 5400  
 actcgccgtg aagactggcg aacagttcat acagagtctt ttacgactca atgacaagaa 5460  
 gaaaatcttc gtcaacatgg tggagcacga cactctcgtc tactccaaga atatcaaga 5520  
 tacagtctca gaagaccaa gggctattga gacttttcaa caaagggtaa tatcgggaaa 5580  
 cctcctcgga ttccattgcc cagctatctg tcacttcata aaaaggacag tagaaaagga 5640  
 aggtggcacc tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gctatcggtc aagatgcctc 5700  
 tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccagcagg agcatcggtg aaaaagaaga 5760  
 cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga 5820

```

tgacgcacaa tcccactatc cttcgcaaga ccttctctct atataaggaa gttcattttca 5880
tttggagagg acacgctgaa atcaccagtc tctctctaca aatcggatcc atgagcccag 5940
aacgacgccc ggccgacatc cgcctgtgcc cggaggcgga catgccggcg gtctgcacca 6000
tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttccg taccgagccg caggaaccgc 6060
aggagtggac ggacgacctc gtccgtctgc gggagcgcta tccctggctc gtcgccgagg 6120
tggacggcga ggtcgccggc atcgccctac cgggcccctg gaaggcacgc aacgcctacg 6180
actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtct ccccccgcca ccagcggacg ggactgggct 6240
ccacgctcta caccacctg ctgaagtccc tggaggcaca gggcttcaag agcgtggctc 6300
ctgtcatcgg gctgcccac gaccgagcg tgcgcatgca cgaggcgctc ggatatgcc 6360
cccgcgcat gctgcgggcg gccggcttca agcacgggaa ctggcatgac gtgggtttct 6420
ggcagctgga cttcagcctg ccggtaccgc cccgtccggt cctgcccgtc accgagatct 6480
gatctcacgc gtctaggatc cgatggatcc cccgatgagc taagctagct atatcatcaa 6540
tttatgtatt acacataata tcgcactcag tctttctatct acggcaatgt accagctgat 6600
ataatcagtt attgaaatat ttctgaattt aaacttgcat caataaattt atgtttttgc 6660
ttggactata atacctgact tgttatttta tcaataaata tttaaactat atttctttca 6720
agatgggaat taacatctac aaattgcctt ttcttatcga ccatgtacat caagcttata 6780
gataccgtcg gctattggta ataggacact gggattcgct ttggacaact ttccttctca 6840
tctaagcgta gacaaccctc aactggaaac gggccggact ccaggcgctg tgccagggtgc 6900
ccacggaata gttttggcca gacccttgaa aatccgattc agtacaatcg attgccctca 6960
tttttacgtt ggcatatata ctgccaaaca gccaaacaac cgcggtcggt gaataggaaa 7020
gcgtttgagt tgcttgetca tategtgacg gttgacagca caggttgacc gcttgatgat 7080
tcgtacgagc cgccaaacat tggctgtcgt aatgatatac catgtcagaa cagcaatccg 7140
atggggcgga aagcattatc ttaatgcaca cggaaatggc gcgtcgggtg gtggaataca 7200
ccgacataga ggccgtaagt tctgcatggt catcgtcgga aagggtggcag caggcgcacg 7260
gctgtggcct cttgctcttt cagcgtgaaa tgcgtgttga aagaataatc gaagagagcg 7320
tccgctcgac accttcaatt atgccgattt gatcgatgaa ctgatcgagc tctgaaatcg 7380
aaggggcttc gataatcgca atcaaataca aagtgccact cacagaatga agagcgataa 7440
cggccgtgac cttcccaagg gaggcgtca cctgtgaaag cgccttcgta atgggtgatca 7500
gaatatgggc tcgaaccaag ctcgagacct cgaggggggg cccggtaccc aattcgccct 7560
atagtgagtc gtattacaat tcactggccg tcgtttttac 7599

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; ADN

<213> Arabidopsis thaliana

14

<400> 6

ggcaagcttg taatacgact cactataggg c

31

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 7

ctagggatcc agccattccc tatgc

25

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: al Application No  
PCT/FR 00/01768

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N15/29 C12N15/82 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBL

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: B26447, 13 October 1997 (1997-10-13) ROUNSLEY, D., ET AL.: "F2K20TF IGF Arabidopsis thaliana genomic clone F2K20." XP002133167 the whole document	1,2
X	DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AB025605, 9 April 1999 (1999-04-09) NAKAMURA, Y.: "Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, BAC clone:F5H8." XP002151497 nts 16471-16549	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 October 2000

Date of mailing of the international search report

10/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: al Application No

PCT/FR 00/01768

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AC012193, 22 October 1999 (1999-10-22) LIN, X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome I BAC T32E8 genomic sequence, complete sequence." XP002151480 nts 40302-42450 ---	1, 2
A	WO 94 02619 A (PIONEER HI BRED INT) 3 February 1994 (1994-02-03)  the whole document ---	1, 4, 6, 8, 11-13, 15-21, 23-25
A	WO 90 07001 A (DU PONT) 28 June 1990 (1990-06-28) page 41, line 20 - line 25 ---	6
A	DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AC007289, 13 April 1999 (1999-04-13) LIN, X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome II BAC F16J10 genomic sequence, complete sequence." XP002133166 nts 34515-34630 ---	1, 2
A	WO 91 13992 A (CAMBRIDGE ADVANCED TECH ; RHONE POULENC LTD (GB); TWYFORD SEEDS LTD) 19 September 1991 (1991-09-19)  the whole document ---	1, 4, 8, 11-13, 15-21, 23-25
A	EP 0 824 150 A (SUMITOMO CHEMICAL CO) 18 February 1998 (1998-02-18)  the whole document ---	1, 4, 8, 11-13, 15-21, 23-25
A	US 5 110 732 A (BENFEY PHILIP N ET AL) 5 May 1992 (1992-05-05)  the whole document ---	1, 4, 8, 11-13, 15-21, 23-25
A	US 5 837 848 A (EVANS IAN JEFFREY ET AL) 17 November 1998 (1998-11-17)  the whole document ---	1, 4, 8, 11-13, 15-21, 23-25
	---	
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: al Application No

PCT/FR 00/01768

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>XIANG CHENGBIN ET AL: "DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in Arabidopsis thaliana."  PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1997,  vol. 34, no. 3, 1997, pages 403-415,  XP002133168  ISSN: 0167-4412  the whole document</p> <p>---</p>	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	<p>VAN DE RHEE MIRANDA D ET AL: "Analysis of regulatory elements involved in stress-induced and organ-specific expression of tobacco acidic and basic beta-1, 3-glucanase genes."  PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1993,  vol. 21, no. 3, 1993, pages 451-461,  XP002133169  ISSN: 0167-4412  the whole document</p> <p>---</p>	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	<p>WEI TAO ET AL: "Structure and characterization of a putative drought-inducible H1 histone gene."  PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1996,  vol. 30, no. 2, 1996, pages 255-268,  XP002133170  ISSN: 0167-4412  the whole document</p> <p>---</p>	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	<p>SUZUKI H ET AL: "Deletion analysis and localization of SbPRP1, a soybean cell wall protein gene, in roots of transgenic tobacco and cowpea."  PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1993,  vol. 21, no. 1, 1993, pages 109-119,  XP002133171  ISSN: 0167-4412  the whole document</p> <p>---</p>	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern 1st Application No

PCT/FR 00/01768

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!  BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,  PHILADELPHIA, PA, US; June 1999 (1999-06)  KAMO K ET AL: "Tissue specificity and  expression level of gusA under rold,  mannopine synthase and translation  elongation factor 1 subunit alpha  promoters in transgenic Gladiolus plants."  Database accession no. PREV199900386225  XP002133172  abstract  &amp; PLANT CELL REPORTS JUNE, 1999,  vol. 18, no. 10, June 1999 (1999-06),  pages 809-815,  ISSN: 0721-7714</p> <p>---</p>	<p>1,4,8,  11-13,  15-21,  23-25</p>
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!  BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,  PHILADELPHIA, PA, US;  23 November 1998 (1998-11-23)  OKRESZ LASZLO ET AL: "T-DNA trapping of a  cryptic promoter identifies and ortholog  of highly conserved SNZ growth arrest  response genes in Arabidopsis."  Database accession no. PREV199900048625  XP002133173  abstract  &amp; PLANT SCIENCE (SHANNON) NOV. 23, 1998,  vol. 138, no. 2,  23 November 1998 (1998-11-23), pages  217-228,  ISSN: 0168-9452</p> <p>---</p>	<p>1,4,8,  11-13,  15-21,  23-25</p>
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!  BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,  PHILADELPHIA, PA, US; April 1999 (1999-04)  MARTIRANI LUCA ET AL: "T-DNA tagging of  nodulation- and root-related genes in  Lotus japonicus: Expression patterns and  potential for promoter trapping and  insertional mutagenesis."  Database accession no. PREV199900213703  XP002133174  abstract  &amp; MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS  APRIL, 1999,  vol. 12, no. 4, April 1999 (1999-04),  pages 275-284,  ISSN: 0894-0282</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1-25</p>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: al Application No  
PCT/FR 00/01768

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LINDSEY K ET AL: "TAGGING GENOMIC SEQUENCES THAT DIRECT TRANSGENE EXPRESSION BY ACTIVATION OF A PROMOTER TRAP IN PLANTS"</p> <p>TRANSGENIC RESEARCH, GB, LONDON, vol. 2, no. 1, 1993, pages 33-47, XP002000606</p> <p>ISSN: 0962-8819</p> <p>the whole document -----</p>	1-25

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern: 1 Application No  
PCT/FR 00/01768

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9402619 A	03-02-1994	US 5401836 A AT 166108 T AU 672618 B AU 4673893 A BR 9306737 A CA 2140014 A DE 69318558 D DE 69318558 T EP 0651813 A JP 8501923 T MX 9304285 A NZ 254577 A	28-03-1995 15-05-1998 10-10-1996 14-02-1994 08-12-1998 03-02-1994 18-06-1998 10-09-1998 10-05-1995 05-03-1996 29-07-1994 25-06-1996
WO 9007001 A	28-06-1990	AU 4828490 A	10-07-1990
WO 9113992 A	19-09-1991	CA 2078327 A EP 0521910 A JP 7501683 T	17-09-1991 13-01-1993 23-02-1995
EP 0824150 A	18-02-1998	JP 10052273 A CA 2212592 A US 5959176 A	24-02-1998 12-02-1998 28-09-1999
US 5110732 A	05-05-1992	AU 641380 B AU 5120790 A	23-09-1993 20-09-1990
US 5837848 A	17-11-1998	NONE	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No  
PCT/FR 00/01768

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12N15/29 C12N15/82 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EP0-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBL

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: B26447, 13 octobre 1997 (1997-10-13) ROUNSLEY, D., ET AL.: "F2K20TF IGF Arabidopsis thaliana genomic clone F2K20." XP002133167 le document en entier</p> <p>---</p>	1,2
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AB025605, 9 avril 1999 (1999-04-09) NAKAMURA, Y.: "Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, BAC clone:F5H8." XP002151497 nts 16471-16549</p> <p>---</p>	1,2

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/11/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Maddox, A

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No  
PCT/FR 00/01768

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AC012193, 22 octobre 1999 (1999-10-22) LIN, X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome I BAC T32E8 genomic sequence, complete sequence." XP002151480 nts 40302-42450 ---	1,2
A	WO 94 02619 A (PIONEER HI BRED INT) 3 février 1994 (1994-02-03)  le document en entier ---	1,4,6,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	WO 90 07001 A (DU PONT) 28 juin 1990 (1990-06-28) page 41, ligne 20 - ligne 25 ---	6
A	DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AC007289, 13 avril 1999 (1999-04-13) LIN. X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome II BAC F16J10 genomic sequence, complete sequence." XP002133166 nts 34515-34630 ---	1,2
A	WO 91 13992 A (CAMBRIDGE ADVANCED TECH ; RHONE POULENC LTD (GB); TWYFORD SEEDS LTD) 19 septembre 1991 (1991-09-19)  le document en entier ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	EP 0 824 150 A (SUMITOMO CHEMICAL CO) 18 février 1998 (1998-02-18)  le document en entier ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	US 5 110 732 A (BENFEY PHILIP N ET AL) 5 mai 1992 (1992-05-05)  le document en entier ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	US 5 837 848 A (EVANS IAN JEFFREY ET AL) 17 novembre 1998 (1998-11-17)  le document en entier ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
	---	
	---/---	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar tationale No  
PCT/FR 00/01768

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>XIANG CHENGBIN ET AL: "DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in Arabidopsis thaliana." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1997, vol. 34, no. 3, 1997, pages 403-415, XP002133168 ISSN: 0167-4412 le document en entier ---</p>	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	<p>VAN DE RHEE MIRANDA D ET AL: "Analysis of regulatory elements involved in stress-induced and organ-specific expression of tobacco acidic and basic beta-1, 3-glucanase genes." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1993, vol. 21, no. 3, 1993, pages 451-461, XP002133169 ISSN: 0167-4412 le document en entier ---</p>	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	<p>WEI TAO ET AL: "Structure and characterization of a putative drought-inducible H1 histone gene." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1996, vol. 30, no. 2, 1996, pages 255-268, XP002133170 ISSN: 0167-4412 le document en entier ---</p>	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	<p>SUZUKI H ET AL: "Deletion analysis and localization of SbPRP1, a soybean cell wall protein gene, in roots of transgenic tobacco and cowpea." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1993, vol. 21, no. 1, 1993, pages 109-119, XP002133171 ISSN: 0167-4412 le document en entier ---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 00/01768

## C. (suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; juin 1999 (1999-06) KAMO K ET AL: "Tissue specificity and expression level of gusA under rold, mannopine synthase and translation elongation factor 1 subunit alpha promoters in transgenic Gladiolus plants." Database accession no. PREV199900386225 XP002133172 abrégé &amp; PLANT CELL REPORTS JUNE, 1999, vol. 18, no. 10, juin 1999 (1999-06), pages 809-815, ISSN: 0721-7714</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25</p>
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 23 novembre 1998 (1998-11-23) OKRESZ LASZLO ET AL: "T-DNA trapping of a cryptic promoter identifies and ortholog of highly conserved SNZ growth arrest response genes in Arabidopsis." Database accession no. PREV199900048625 XP002133173 abrégé &amp; PLANT SCIENCE (SHANNON) NOV. 23, 1998, vol. 138, no. 2, 23 novembre 1998 (1998-11-23), pages 217-228, ISSN: 0168-9452</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25</p>
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; avril 1999 (1999-04) MARTIRANI LUCA ET AL: "T-DNA tagging of nodulation- and root-related genes in Lotus japonicus: Expression patterns and potential for promoter trapping and insertional mutagenesis." Database accession no. PREV199900213703 XP002133174 abrégé &amp; MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS APRIL, 1999, vol. 12, no. 4, avril 1999 (1999-04), pages 275-284, ISSN: 0894-0282</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1-25</p>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No

PCT/FR 00/01768

## C. (suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>LINDSEY K ET AL: "TAGGING GENOMIC SEQUENCES THAT DIRECT TRANSGENE EXPRESSION BY ACTIVATION OF A PROMOTER TRAP IN PLANTS"</p> <p>TRANSGENIC RESEARCH, GB, LONDON, vol. 2, no. 1, 1993, pages 33-47, XP002000606</p> <p>ISSN: 0962-8819</p> <p>le document en entier</p> <p>-----</p>	1-25